



Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Caracterización de la respuesta inmune suscitada tras la administración de extractos de *Dermatophagoides pteronyssinus* en ratones BALB/c. Efecto inmunomodulador de los adyuvantes hidróxido de aluminio y ODN con motivos CpG

Memoria Presentada por el Licenciado

Yago Pico de Coaña Suárez

para optar al grado de Doctor en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis
Dr. Carlos Alonso Bedate
Dra. Nuria Parody de la Fuente

Madrid, Noviembre de 2008

Una Tesis Doctoral es fruto de un trabajo en equipo; aunque el título sólo se lo den a una persona, siempre hay más de un “culpable”. Esta aventura empezó en septiembre de 2003, y por el camino me he encontrado con mucha gente dispuesta a ayudar, a poner su granito de arena. Es difícil acordarse de todos, pero voy a intentarlo.

En primer lugar quiero agradecerle al Profesor Carlos Alonso por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Con él he aprendido a pensar las cosas y a buscar el punto de vista adecuado. Mis sonrisas durante los debates (en algún caso, discusiones) y correcciones son fruto de admiración. Gracias Carlos por enseñarme el camino, por tu tiempo y tu paciencia.

A la Dra. Nuria Parody tengo muchas cosas que agradecerle. Has sido tú la que ha puesto el orden y la disciplina al método de trabajo. Me has pinchado cuando era necesario y, cuando las cosas estaban muy cuesta arriba, tu apoyo moral me permitió seguir adelante.

El Profesor Alberto Martínez Serrano me acogió en su laboratorio después de la mudanza y desde el primer día me dejó muy claro que no estaba “de prestado”, que era un miembro más del 305. Gracias Alberto.

Si no hubiera sido por el Profesor José María Requena, no hubiese llegado al CX-203; gracias José María por haberme concedido la primera entrevista y por haberme recibido en Madrid aquél 1 de septiembre.

Al Profesor Manuel Soto por enseñarme los truquillos de la Biología Molecular y por buscarme un hueco cuando las cosas se pusieron difíciles. Gracias Manolo.

El profesor Pedro Bonay también es otro de los que me ha acogido con mucho cariño. Muchas gracias Pedro por prestarme tu laboratorio y recibirme siempre con una sonrisa.

A todos los que pasaron por el CX-203 también quiero darles las gracias: a Dani (tienes una llamada), Javi, Manolo, Vicky, Josema, Cristina, Graciela, Miguel Ángel, Alfonso, Anabel y Nadia quiero agradecerles su compañerismo y los buenos ratos que hemos pasado juntos. ¿Será posible que nos reunamos todos otra vez algún día?

Hubo un grupo de personas que me recibió con los brazos abiertos al llegar de “intruso” a su laboratorio, todos los del 305 se han portado fenomenal conmigo: Gracias a Emma, a Elise (PC forever), a Elisa, a la paciente Bea, a Claudia (estadísticamente significativa), a Mila, a Isabel, a Kathy, a Miguel y a Ignacio. Desde el primer día me he sentido en casa con vosotros.

Desde luego que no puedo olvidarme de mis nannies: LaNury, LaCris, LaClaudia, Graci y Ji, que han estado siempre cerca para sacarme de los líos y echarme una mano con lo que hiciera falta.

El equipo de los Western también fue fundamental, sobre todo en los momentos finales de agobio: gracias a Ignacio, a Nuria y, sobre todo, a Jimena.

Gracias a Mada y a Reyes por la paciencia que han tenido conmigo y con mi “especial” manera de hacer cualquier tipo de papeleo.

Quería también agradecerle al personal de los servicios del centro su colaboración para la realización de esta tesis. Gracias al personal de compras, cocinas, citometría, genómica, fotografía, biblioteca, administración, secretaria y al personal del animalario.

El profesor Manuel Elkin Patarroyo me metió en “esto de la ciencia”. Para mí es un orgullo haber sido parte de tu proyecto, de tu misión. “Las musas no existen, solo cuenta el trabajo” me dijiste un día. Muchas gracias “Jefe”.

A todos los compañeros de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, en particular a la sección de Malaria: Carlos, Paulis, Pili, Paola, Camilo, Elvia, Isabela, Adrianita, Cata, Andrómeda, Veronika, Alexandra, Eduar, Pepa, William y Manuel Alfonso. Seguimos siendo una familia a pesar de las distancias.

A los Pichis, Carraspines y demás también quiero darles las gracias: Gonzalo, Borja, Karimo, Manu, Pocha, Juanito, Peloto, Françoise, Iván, Manena, Primo Edu, David, Susana, Guille, Vinu, Manolito, David, Elisa, Ana, Chloe, Paula, Dano, Pabliño, Ana María... Vuestra amistad no tiene precio y sabéis muy bien que sin vosotros nunca habría sido capaz de llegar hasta aquí.

Mis dos primos Doctores en Biología, Joaqui y Venán, así como mi tía Trudis, Doctora en Químicas, han sido desde pequeño una fuente de inspiración de lo que quería ser de mayor.

Patricia muchas gracias por todo. El día 16 de los inmunizados con extracto Nativo y AIOH está dedicado a ti. Gracias por animarme, por hacerme reír, por entenderme... gracias a ti esta tesis es sólo lo segundo más importante que me ha pasado en 2008.

A mis hermanas, Leticia y Mercedes quiero darles las gracias por muchas cosas. Son un modelo a imitar en cuanto a constancia y dedicación. Gracias sobre todo por lo que han cuidado de su hermanito. Tiriwakis.

Finalmente gracias a mis padres, por la educación que me han dado, por su apoyo incondicional y por la fe que siempre han tenido en mí. Esta tesis es para vosotros.

No basta saber dónde está el tesoro; hace falta trabajar y sacarlo

Francisco de Quevedo

No me avergüenza confesar la ignorancia de lo que no sé

Cicerón

| | |
|---|-----------|
| Abstract | 1 |
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1. Alergia | 5 |
| 1.1.1. Epidemiología | 6 |
| 1.1.2. Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a alérgenos | 7 |
| 1.1.3. Tratamiento | 10 |
| 1.1.4. Mecanismos de acción de la inmunoterapia específica | 11 |
| Células presentadoras | 11 |
| Modulación de la respuesta de linfocitos T | 12 |
| Modulación de la respuesta humoral | 12 |
| 1.1.5. Modelos animales para el estudio de la alergia | 13 |
| 1.2. Los ácaros domésticos | 14 |
| 1.2.1. Biología y ciclo de vida | 14 |
| 1.2.2. Especies de relevancia alérgica y distribución | 15 |
| 1.2.3. Alérgenos descritos | 16 |
| 1.3. Inmunoterapia específica con alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i> | 18 |
| 1.3.1. Extractos de alérgenos modificados | 18 |
| 1.3.2. Uso de adyuvantes como inmunomoduladores durante la inmunoterapia específica | 20 |
| 2. Objetivos | 25 |
| 3. Materiales y métodos | 29 |
| 3.1. Reactivos y soluciones. | 29 |
| 3.2. Extractos de <i>D. pteronyssinus</i> | 29 |
| 3.3. Electroforesis y cuantificación de proteínas | 29 |
| 3.4. Animales de experimentación. | 29 |
| 3.5. Adyuvantes empleados en las inmunizaciones. | 30 |
| 3.6. Pautas de inmunización y obtención de sueros. | 30 |
| 3.7. Ensayos de E.L.I.S.A. | 30 |
| 3.8. Detección de niveles de IgE totales en sueros de ratones inmunizados | 31 |
| 3.9. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF | 31 |
| 3.10. Ensayos de inhibición de reactividad cruzada | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.11. Cuantificación de la expresión de citoquinas en sobrenadantes de cultivo | 32 |
| 3.12. Inmunodetección de proteínas de membrana mediante citometría de flujo. | 33 |
| 3.13. Análisis estadístico | 33 |
| 4. Resultados | 37 |
| 4.1. Caracterización de los extractos de <i>D. pteronyssinus</i> | 37 |
| 4.2. Inmunogenicidad de los extractos de <i>D. pteronyssinus</i> | 38 |
| 4.2.1. Respuesta frente a extracto nativo en función de la dosis | 38 |
| 4.2.2. Inmunogenicidad de los extractos nativo despigmentado y polimerizado e inmunomodulación inducida por su inoculación en combinación con adyuvantes | 39 |
| Reactividad IgG total frente al extracto nativo | 40 |
| Modulación mediada por adyuvantes de la respuesta IgG1/IgG2a frente al extracto nativo | 42 |
| Niveles totales de IgE | 44 |
| Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF | 45 |
| Ensayos de inhibición de reactividad cruzada | 46 |
| 4.3. Respuesta celular: producción de citoquinas in vitro por parte de esplenocitos de ratones inmunizados | 49 |
| 4.3.1. Citoquinas de tipo Th1 | 50 |
| IL-2 | 50 |
| IFN- γ | 50 |
| 4.3.2. Citoquinas de tipo Th2 | 51 |
| IL-4 | 51 |
| IL-5 | 51 |
| 4.3.3. Citoquinas reguladoras: IL-10 | 53 |
| 4.3.4. Citoquinas Th-17: IL-17 | 53 |
| 4.3.5. Citoquinas proinflamatorias | 54 |
| IL-1 α | 54 |
| TNF- α | 55 |
| 4.3.6. Citoquinas de tipo Th2 proinflamatorias: IL-6 | 55 |
| 4.3.7. Respuesta frente a la estimulación cruzada con extracto nativo de los grupos inmunizados con extracto despigmentado y polimerizado | 56 |
| IL-2 | 57 |
| IFN- γ | 58 |
| IL-4 | 58 |
| IL-5 | 58 |
| IL-10 | 59 |
| IL-17 | 59 |

| | |
|--|-----------|
| IL1- α | 59 |
| TNF- α | 59 |
| IL-6 | 59 |
| 4.4. Variaciones en la composición de poblaciones celulares en ganglio drenante tras la inmunización con los distintos extractos y adyuvantes | 61 |
| 4.4.1. Variaciones en la población de linfocitos B | 61 |
| 4.4.2. Variaciones en las poblaciones de linfocitos T | 64 |
| 4.4.3. Reclutamiento de células dendríticas (CD11c+) | 69 |
| 4.5. Caracterización inmunobiológica del compuesto “C” | 70 |
| 4.5.1. Respuesta humoral de animales inoculados con compuesto “C” | 70 |
| 4.5.2. Variación de las poblaciones celulares en ganglio | 71 |
| 4.5.3. Viabilidad de esplenocitos de ratón cultivados en presencia de compuesto “C” | 72 |
| 5. Discusión | 77 |
| 5.1. Propiedades inmunoquímicas de los extractos modificados de <i>D. pteronyssinus</i> | 78 |
| 5.2. Caracterización de la respuesta humoral | 79 |
| 5.3. Estudio de la respuesta local en ganglio drenante | 82 |
| 5.4. Modulación del perfil de citoquinas | 84 |
| 5.5. Hipótesis del mecanismo de respuesta de las distintas formulaciones | 87 |
| 6. Conclusiones | 95 |
| 7. Bibliografía | 98 |

Abreviaturas usadas

AlOH: Hidróxido de Aluminio

Con A: Concanavalina A

CD: Del inglés *Cluster of Differentiation*

CpG: Oligodeoxinucleótidos con motivos CpG

D.O.: Densidad Óptica

E.L.I.S.A.: Del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fc block: Anticuerpo de unión a receptores de inmunoglobulinas en la superficie celular.

GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulomonocíticas

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IFN: Interferón

HR: Humerad relativa

IP: Ioduro de propidio

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

pDC: Células dendríticas plasmacitoides

ODN: Oligodeoxinucleótido

OPD: 1,2- diclorhidrato de fenilendiamina

PBS: Tampón salino fosfato

PBSs: Tampón salino fosfato con suero fetal bovino al 1%

PE: Ficoeritrina

FITC: Fitocromo C

PVDF: Polivinilidenofluoruro

SIT: Inmunoterapia específica, del inglés *Specific Immunotherapy*

SDS-PAGE: Del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

TGF: Factor de crecimiento transformante

Th: Del inglés *T-helper*

T_{reg}: T reguladora

TLR: Receptor de tipo Toll, del inglés *Toll-Like Receptor*

TNF: Factor de necrosis tumoral

Abstract

Abstract

Type I allergy is an immunological disorder which affects more than 25% of the population in the industrialized world. Allergic patients are characterized by a strong IgE-mediated Th2 response when challenged with otherwise innocuous antigens known as allergens. Treatment strategies for allergic diseases include medication aimed towards symptomatic relief and allergen-specific immunotherapy (SIT). SIT has been used since the early 1900s and involves the regular subcutaneous injection of increasing doses of allergen extract eventually leading to allergen tolerance. SIT is the only treatment approach that modifies the immune response towards allergens and is capable of long term reduction of symptom and medication scores, achieving an overall improvement in the patient's quality of life as well as decreasing the development of sensitization to new allergens. The mechanisms by which SIT exerts its beneficial effects remain incompletely defined. However, multiple studies show that SIT modifies the responses of APCs, T cells and B cells generating a Th1-Treg response that implies overall increases in IFN- γ , IL-10 and TGF- β production. Clinical efficacy of SIT is dose dependant, a fact that involves potential side effects such as anaphylactic shock.

Several strategies have been developed in order to improve the safety and efficacy of traditional SIT. These alternatives mainly involve the administration of hypoallergenic vaccines with low IgE-binding properties which can be generated by recombinant DNA technology or by chemical modification of allergen extracts. Chemically modified extracts from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* have proven increased safety and efficacy in several clinical trials.

A second approach includes the use of novel adjuvants that contribute to a Th1-oriented balance of the Th2 response that takes place during an allergic reaction. Currently aluminum hydroxide is the adjuvant of choice in conventional SIT; however it might not be the ideal immunostimulatory agent due to its association with the generation of Th2 responses. On the contrary, CpG-containing immunostimulatory DNA sequences have shown to be able to generate Th1 responses through activation of TLR-9 receptors and may be a better adjuvant choice for SIT.

In this dissertation we analyze the immune response in BALB/c mice when several formulations that included one native extract and two chemically modified (depigmented extract and depigmented and polymerized extract) from the house dust mite *D. pteronyssinus* were inoculated in the presence or absence of two adjuvants: aluminum hydroxide or CpG-containing immunostimulatory DNA ODNs. Our results show that the three extracts induced Th2 responses when administered without adjuvants. When the native extract was adsorbed onto aluminum hydroxide, a strong Th2 response was observed along with high IgE levels. Administration of the depigmented extract with aluminum hydroxide resulted in a Th2 response with reduced IgE production levels. The polymerized extract inoculated in the presence of aluminum hydroxide elicited a Th2 response, but we also observed higher IFN- γ levels than those observed after inoculation of the native and depigmented extracts after in vitro stimulation of cultured splenocytes. CpG-containing oligonucleotides induced a Th1 (and probably a Th1-Treg) response in BALB/c mice when used as an adjuvant with each extract. This Th1 response was stronger when the modified extracts were inoculated, achieving higher IFN- γ and IL-10 levels after in vitro stimulation.

Our results indicate that the polymerized extract is the better choice due to its hypoallergenic properties when used with the traditional adjuvant aluminum hydroxide. Administration of this low IgE-binding extract in combination with CpG-containing immunostimulatory oligonucleotides could be considered as a promising alternative to improve the efficacy of house dust mite-specific immunotherapy.

Introducción

1. Introducción

1.1. Alergia

El término alergia fue introducido a principios del siglo XX por von Pirquet como “una capacidad alterada del cuerpo para reaccionar frente a una sustancia extraña” (von Pirquet, 1906). La alergia o hipersensibilidad, es una enfermedad en la que el sistema inmune responde de forma más o menos patológica al contacto con antígenos ambientales inocuos (alérgenos).

Tabla 1. Reacciones alérgicas mediadas por IgE

| Síndrome | Alergenos que lo inducen | Vía de entrada | Respuesta |
|------------------------------------|---|---|---|
| Anafilaxis sistémica | Fármacos Suero Veneno Cacahuètes | Intravenosa (directamente o posterior a una absorción rápida) | Edema Incremento de la permeabilidad vascular Oclusión traqueal Colapso circulatorio Muerte |
| Urticaria aguda | Picaduras de insectos Pruebas de alergia | Subcutánea | Incremento local de circulación sanguínea y de la permeabilidad vascular |
| Rinitis Alérgica (Fiebre del Heno) | Pólenes | Inhalación | Edema e irritación de las mucosas nasales |
| Asma | Heces de Ácaros Pólenes Heces de Ácaros | Inhalación | Broncoconstricción Incremento de la producción de moco Inflamación de las vías respiratorias |
| Alergias Alimentarias | Marisco Leche Huevos Pescado Trigo... | Oral | Vómitos Diarrea Prurito Urticaria Anafilaxis |

Se conocen actualmente cuatro tipos de hipersensibilidad. Las tres primeras están mediadas por anticuerpos y se diferencian entre sí por el tipo de antígeno que las provoca y por la clase de inmunoglobulina que media en su desarrollo, el cuarto tipo de hipersensibilidad está mediado por linfocitos T (Janeway, 2005):

- Las respuestas de Tipo I están dirigidas contra antígenos solubles y son mediadas por IgE (Alergia).
- Las de tipo II, dirigidas contra antígenos presentes en superficie de la membrana o asociados a matrices extracelulares y mediadas por IgG (Síndrome de Goodpasture, Enfermedad de Graves, Miastenia gravis, Eritroblastosis fetal, Pénfigo, Anemia perniciosa autoinmune).

- La hipersensibilidad de tipo III está dirigida contra antígenos solubles y es mediada por IgG (Artritis reumatoide, Enfermedad del suero, Lupus eritematoso sistémico, Glomerulonefritis por complejos inmunes).
- La hipersensibilidad de tipo IV, mediada por linfocitos T y dirigida contra antígenos tanto solubles como asociados a células (Dermatitis por contacto, Enfermedad celíaca, Rechazo de trasplantes).

Más del 25% de la población de países desarrollados sufre alergias mediadas por IgE, la forma más común de hipersensibilidad. Las reacciones alérgicas de tipo I ocurren cuando un individuo que haya producido IgE en respuesta a un antígeno ino-
cua (alérgeno) se reencuentra con él. La presencia del alérgeno dispara la activación de mastocitos capaces de unir IgE en el tejido expuesto, hecho que conduce a una serie de manifestaciones clínicas locales o sistémicas que se conocen como alergia (Tabla 1) (Janeway, 2005).

1.1.1. Epidemiología

La rinoconjuntivitis alérgica, el asma y la dermatitis atópica se encuentran entre las enfermedades crónicas más comunes en Europa y Norteamérica. Sin embargo en el siglo XIX, estas enfermedades se mencionaban en la literatura médica como casos excepcionales. La incidencia de enfermedades autoinmunes y alergias ha ido aumentando progresivamente desde entonces, disparándose en los últimos 30 años, sobre todo en países desarrollados (Olesen *et al.*, 1997; Gustafsson *et al.*, 2000; Bach, 2002; Moore *et al.*, 2004; Purvis *et al.*, 2005; Halkjaer *et al.*, 2006).

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la prevalencia de las enfermedades asociadas a hipersensibilidad mediada por IgE en el marco del Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia (ISAAC) (Shah, 1994; Asher *et al.*, 1995; Fernandez Benitez *et al.*, 1996; ISAAC, 1998b, a; Williams *et al.*, 1999; Mallol *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001; Vanna *et al.*, 2001; Falade *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Weiland *et al.*, 2004; Ellwood *et al.*, 2005; Asher, 2007; Pearce *et al.*, 2007; Bjorksten *et al.*, 2008). En general, se aprecia que los países más occidentalizados muestran incidencias hasta 60 veces mayores que las de aquellos menos desarrollados hasta el punto en que en algunos países como el Reino Unido, Nueva Zelanda, Australia y Estados Unidos, uno de cada tres niños acude al médico a causa de la alergia y se habla de una incipiente epidemia de alergia (Gould y Sutton, 2008).

1.1.2. Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a alérgenos

Para que un individuo sea considerado alérgico tiene que haber pasado por un periodo de sensibilización en el que, por primera vez, entra en contacto con el alérgeno en cuestión. Durante esta fase, cantidades mínimas de alérgeno soluble son fagocitadas por células dendríticas que presentan el antígeno a linfocitos T vírgenes que, al ser activados se polarizan hacia un tipo de respuesta Th2, produciendo, entre otras, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y GM-CSF. Estas citoquinas están involucradas en los distintos procesos que favorecen el desarrollo de una respuesta alérgica (Figura 1) (Larche *et al.*, 2006):

- Cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos B a IgE (IL-4 e IL-13)
- Reclutamiento de mastocitos (IL-4, IL-9 e IL-13)
- Maduración de eosinófilos (IL-3, IL-5 y GM-CSF) y basófilos (IL-3 e IL-4)

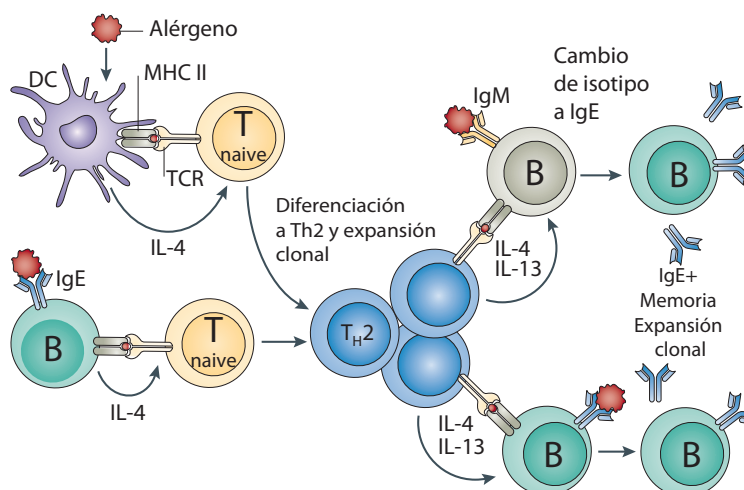


Figura 1. Sensibilización y memoria (modificado de Larche *et al.*, 2006)

El desequilibrio entre las respuestas Th2 y Th1 se considera el eje central de las enfermedades alérgicas y su origen se encuentra actualmente en discusión. Se sugiere que el propio microambiente del tracto respiratorio favorece esta polarización (Holgate, 2007a, b; Schleimer *et al.*, 2007), y también pueden tener influencia el genotipo del individuo (Cardaba *et al.*, 2007; Koppelman, 2007; Lugogo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008), la dosis y/o la conformación antigénica (Akdis *et al.*, 1998), la naturaleza y el número de células presentadoras involucradas (Jahnsen *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000), la duración de la presentación al receptor de células T (Constant *et al.*, 1995) así como la presencia de histamina y otros mediadores biológicos (Mazzoni *et al.*, 2001).

Recientemente se ha descrito un nuevo subtipo de linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T reguladores (T_{reg}), que actúan como pivote en la regulación de la polarización de las respuestas Th1/Th2. Estas células se caracterizan por la expresión del factor de crecimiento *Forkhead box P3* (FoxP3) y el receptor de IL-12 (Wing *et al.*, 2006), pero al contrario que los linfocitos T activados, expresan niveles bajos de CD127 (Seddiki *et al.*, 2006). Las células T_{reg} están relacionadas con la supresión de respuestas alérgicas en ratones (Bacchetta *et al.*, 2007) y en humanos controlan las respuestas Th2 mediante la producción de IL-10 y factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) (Larche, 2007) (Figura 2). Esta población celular juega un papel muy importante tanto en la fase de sensibilización, como en el control de respuestas Th1 ó Th2 exacerbadas durante las respuestas agudas y crónicas.

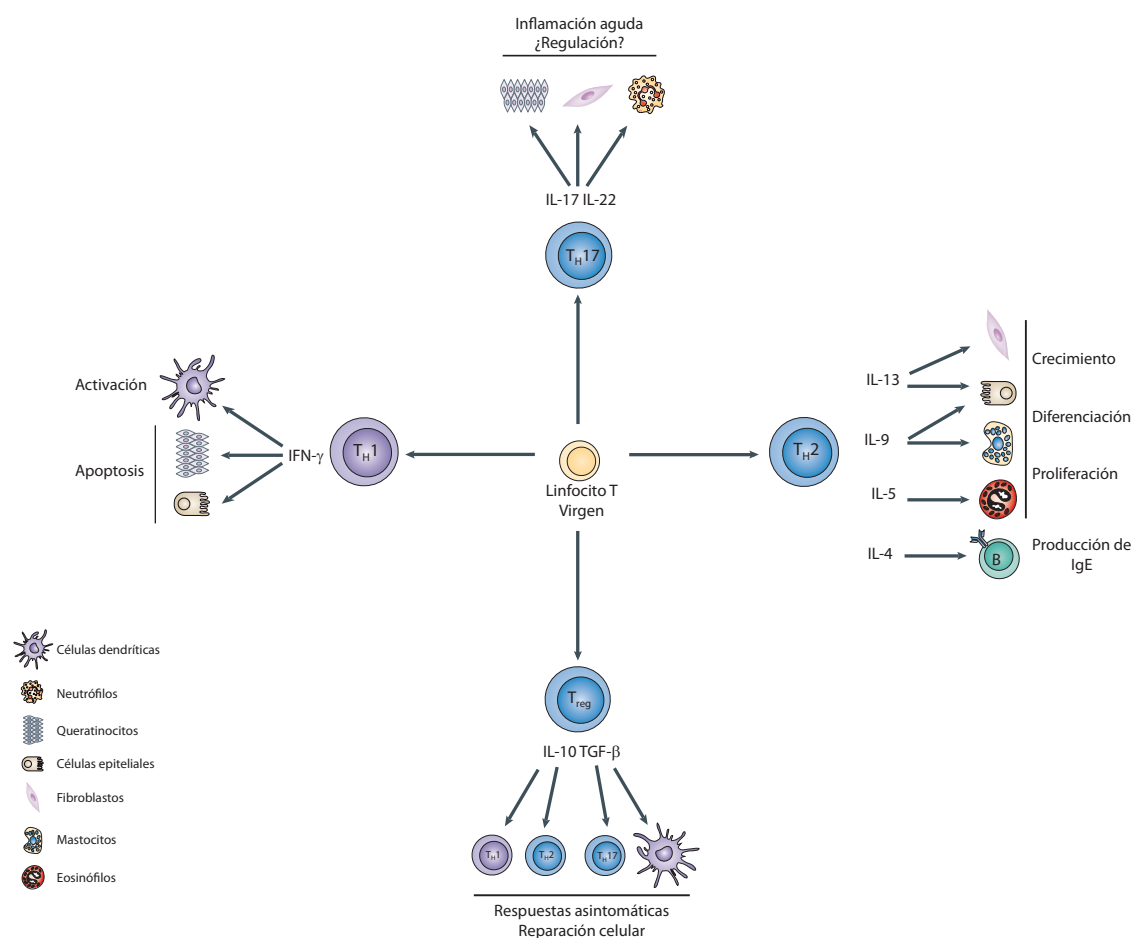


Figura 2. Poblaciones de linfocitos T y su papel en alergia

Una vez que un individuo se ha sensibilizado y se reencuentra con el alérgeno, la reacción alérgica se desencadena cuando éste es reconocido por IgE que está previamente ligada al receptor FcεRI de mastocitos y basófilos. Este hecho provoca su desgranulación y la liberación al medio una serie de efectores (histamina, mediadores lipídicos, quimioquinas y otras citoquinas). La reacción alérgica se divide en dos fases: la inmediata y la tardía.

Durante la reacción inmediata, que ocurre en los primeros treinta minutos, los mastocitos y basófilos se desgranulan y liberan los mediadores principales de la respuesta alérgica (Janeway, 2005; Larche *et al.*, 2006):

- Histamina: aumenta la permeabilidad vascular y favorece la contracción del músculo liso.
- Mediadores lipídicos: leucotrienos C4 y T4 (promueven la secreción de moco, favorecen la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso) y factor activador de plaquetas (atrae linfocitos por quimiotaxis, retroalimenta la producción de mediadores lipídicos y activa neutrófilos, eosinófilos y plaquetas).
- Quimioquinas: CXCL8 (IL-8), CXCL10, CCL2, CCL4 y CCL5 que atraen linfocitos T, células dendríticas, eosinófilos, monocitos y mastocitos.
- Citoquinas: amplifican la polarización hacia Th2 (IL-4 e IL-13) y activan eosinófilos (IL-3 e IL-5).

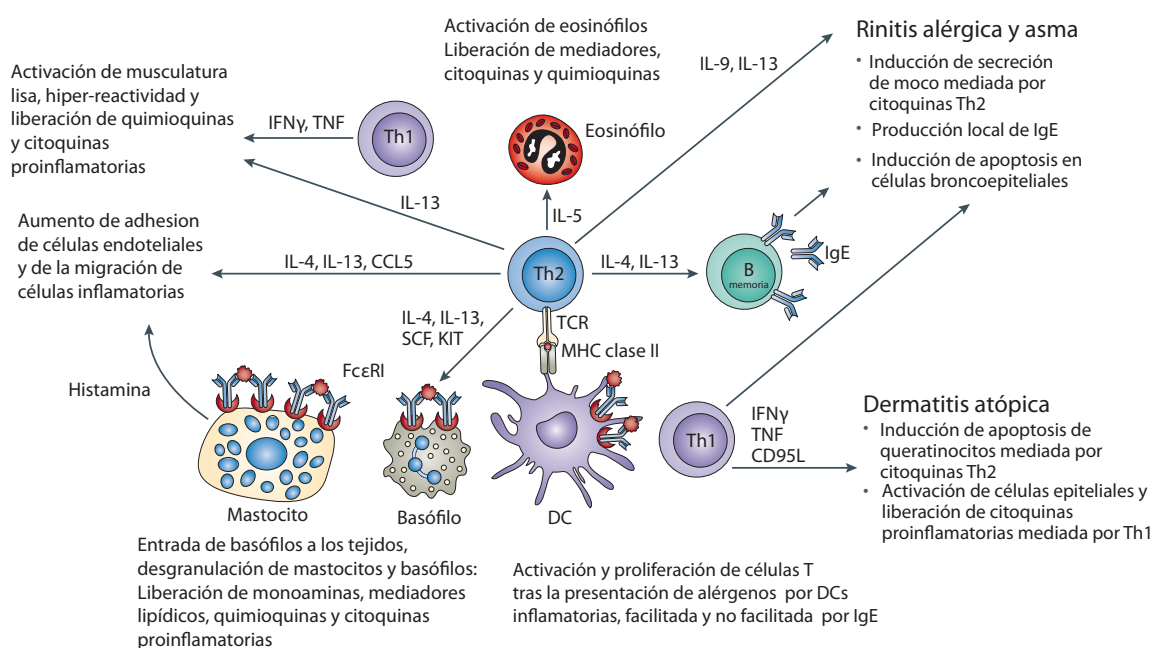


Figura 3. Respuesta tardía y procesos de inflamación crónica (modificado de Larche *et al.*, 2006)

En determinados casos, los más graves, se pueden producir respuestas tardías que están asociadas con casos crónicos de alergia como el asma o la dermatitis atópica (Figura 3). La respuesta tardía, que ocurre entre 6 y 72 horas después de la inmediata, está mediada principalmente por linfocitos Th2. Ésta se dispara dado que la IgE también se une al receptor Fc ϵ RI de células dendríticas y monocitos y al receptor de baja afinidad Fc ϵ RII (CD23) de la superficie de linfocitos B. Este hecho aumenta la captura de alérgeno por parte de estas células presentadoras y su presentación a linfocitos T CD4+

específicos productores de IL-5 que induce la desgranulación de eosinófilos y su correspondiente liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas (Proteína Mayor Básica, leucotrienos, IL-3, GM-CSF, IL-8) (Janeway, 2005; Larche *et al.*, 2006). Durante la fase tardía de la respuesta también intervienen mastocitos y basófilos, que se desgranulan, liberando los mediadores anteriormente mencionados. En pacientes con dermatitis atópica se han encontrado poblaciones de linfocitos Th1, cuya producción de interferón- γ (IFN- γ) induce apoptosis en queratinocitos y favorece los procesos inflamatorios asociados a esta enfermedad (Schmidt-Weber *et al.*, 2007). Las células Th17, un tipo de linfocito T CD4⁺ recientemente descrito, también juegan un papel importante en los procesos de inflamación de la respuesta tardía (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Esta población celular se caracteriza por la producción de IL-17 e IL-22, citoquina asociada con procesos inflamatorios mediados por neutrófilos. Se han encontrado niveles altos de esta citoquina en las vías respiratorias de pacientes asmáticos e induce la producción de IL-8 en las células de la musculatura lisa de éstas.

1.1.3. Tratamiento

La primera aproximación al tratamiento de las enfermedades alérgicas consiste en paliar los síntomas mediante fármacos. Los corticosteroides aplicados localmente, efectivos sobre todo en casos de asma y dermatitis atópica, suprimen la inflamación mediada por linfocitos Th2 inhibiendo la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (Barnes *et al.*, 1998). Los antihistamínicos actúan como antagonistas del receptor H1 de histamina, el principal mediador liberado por mastocitos y eosinófilos durante la respuesta inmediata (Holgate, 2007a).

Los efectos secundarios provocados por estos medicamentos han sido parcialmente superados gracias a la aparición de antihistamínicos no sedantes de segunda generación y de nuevas formas de aplicación directa de corticosteroides que minimizan la dosis necesaria. Aún así, la eficacia del tratamiento sintomático además de no ir más allá de su duración es únicamente paliativo o, en el mejor de los casos, profiláctico.

La inmunoterapia específica o SIT (del inglés *Specific Immunotherapy*), es el único tratamiento capaz de cambiar la respuesta inmune del paciente modificando el desarrollo de la enfermedad. A principios del siglo pasado, Leonard Noon inmunizó pacientes que sufrían rinitis alérgica inducida por polen con inyecciones subcutáneas de extractos de polen (Noon, 1911). Aunque este trabajo se basaba en la creencia errónea de que una toxina presente en el polen de gramíneas era la responsable de la enfermedad, algunos pacientes desarrollaron tolerancia que se mantuvo durante al menos un año después del tratamiento.

Se ha demostrado que la inmunoterapia específica es capaz de prevenir nuevas sensibilizaciones a otros alérgenos y de reducir el desarrollo de asma en pacientes alérgicos. La SIT mejora la calidad de vida de los pacientes provocando una disminución de los episodios y la necesidad de medicación e incluso la desaparición a largo plazo de la sintomatología (Akdis y Blaser, 2000; Valenta, 2002; Larche *et al.*, 2006).

La SIT consiste en la inyección subcutánea (o más recientemente, aplicación sublingual) de dosis crecientes de extractos del alérgeno en cuestión con el objeto de inducir tolerancia en el paciente. Una vez que se consigue, esta tolerancia puede durar varios años sin necesidad de tratamiento (Durham *et al.*, 1999).

1.1.4. Mecanismos de acción de la inmunoterapia específica

Aunque en la actualidad los mecanismos de acción de la SIT no están completamente definidos, se sabe que el desequilibrio de las respuestas Th2 y Th1 es el hecho diferenciador entre una respuesta normal en individuos sanos y una respuesta patológica en pacientes alérgicos. Una inmunoterapia efectiva implica necesariamente la inducción de tolerancia específica y la reversión del patrón de citoquinas Th2 característico hacia una respuesta T_{reg} -Th1 (Akdis y Blaser, 2000). Estos efectos se consiguen modificando las respuestas de células presentadoras, linfocitos T y linfocitos B, así como reduciendo el número y la activación de las células efectoras que intervienen en la respuesta alérgica (Larche *et al.*, 2006).

Células presentadoras

Las células dendríticas controlan tanto la tolerancia como la inmunidad periférica mediante la interpretación de señales ambientales asociadas con el encuentro con sustancias antigénicas. Su función tolerogénica depende del estado de maduración, del estado de activación y de su linaje (mieloide o plasmacitoide). Estas tres características pueden ser moduladas mediante el uso de adyuvantes (Guy, 2007). En experimentos llevados a cabo en ratones BALB/c se ha comprobado que, en ausencia de señales proinflamatorias, las células dendríticas de las vías respiratorias tienen un fenotipo parcialmente maduro que resulta en una interacción tolerogénica con linfocitos T (Lambrecht *et al.*, 2000). Estas observaciones coinciden con estudios en el mismo modelo (Akbari *et al.*, 2001) y *ex vivo* (Jonuleit *et al.*, 2000), que identifican células dendríticas inmaduras como productoras de IL-10 y las relacionan con la aparición de linfocitos T $CD4^+$ con fenotipo T_{reg} capaces de inhibir respuestas inflamatorias.

Modulación de la respuesta de linfocitos T

Los linfocitos T CD4⁺ de individuos sanos reconocen los mismos epítomos T que los de pacientes alérgicos. Sin embargo, la población predominante de linfocitos T CD4⁺ específica para alérgeno en los primeros es de fenotipo T_{reg}, al contrario que en pacientes alérgicos, en los que predominan los de tipo Th2 (Akdis *et al.*, 2004). Los mecanismos mediante los cuales la SIT revierte este fenotipo implican un aumento en la relación de citoquinas Th1/Th2 (Ebner *et al.*, 1997), la inducción de anergia en linfocitos T mediada por IL-10 (Akdis *et al.*, 1996), la generación de células T_{reg} específicas para alérgeno capaces de suprimir las respuestas de células T efectoras (Jutel *et al.*, 2003; Verhoef *et al.*, 2005) y un aumento en la producción de citoquinas de carácter regulador como IL-10 y TGF- β (Akdis y Blaser, 2000; Larche *et al.*, 2006; Larche, 2007). La IL-10 generada en respuesta a la inmunoterapia no solo afecta a linfocitos T, sino que también modula la acción de las células efectoras de la respuesta alérgica, inhibiendo la activación dependiente de IgE de mastocitos (Royer *et al.*, 2001), y la producción de GM-CSF y CD40 por parte de eosinófilos así como su muerte celular (Ohkawara *et al.*, 1996).

Modulación de la respuesta humoral

Robert Cooke demostró en 1935 que el suero de pacientes vacunados con extractos de polen de ambrosía contenía factores específicos que prevenían la inflamación inmediata producida por un alérgeno (Cooke *et al.*, 1935). Estos factores protectores se identificaron como moléculas de IgG específicas que competían con la IgE por la unión del alérgeno y se denominaron anticuerpos bloqueantes (Lichtenstein *et al.*, 1968). Sin embargo, la relación entre la eficacia de la SIT y las concentraciones de IgG en suero todavía crea controversia, dada la disparidad de los resultados obtenidos (Larche *et al.*, 2006). La funcionalidad de los anticuerpos, más que su cantidad parece determinante en el resultado de una terapia de vacunación (Nouri-Aria *et al.*, 2004). La IgG específica de alérgeno puede estar dirigida contra el mismo epítomo que la IgE, resultando en un anticuerpo bloqueante que compite directamente por la unión de antígeno con ésta. Sin embargo, también puede estar dirigida contra otros epítomos resultando en un efecto nulo o incluso nocivo, ya que en algunos casos facilita la formación de complejos IgE-Fc ϵ RI (Denepoux *et al.*, 2000).

El análisis de los isotipos de IgG que induce la inmunoterapia en humanos muestra que particularmente aumentan los títulos de IgG1 e IgG4, y, en mucha menor medida, los de IgG2 (Larche *et al.*, 2006). El papel de IgG4 parece decisivo ya que la eliminación de su actividad en sueros de pacientes inmunizados resulta en una pérdida casi total de la capacidad de estos sueros de inhibir la unión de complejos alérgeno-IgE al receptor Fc ϵ RII en la superficie de linfocitos B. También es interesante señalar que, a pesar de que una citoquina Th1 como el IFN- γ aumente la producción de IgG2 y disminuya la de IgG1

(Kawano *et al.*, 1994), la presencia de IL-10 favorece el cambio de isotipo a IgG1 (Briere *et al.*, 1994). El hecho de que la relación IgG1/IgG2 favorezca a la primera puede ser un indicativo de que el efecto del IFN- γ esté mitigado por otras citoquinas como IL-4 e IL-10 (Larche *et al.*, 2006).

1.1.5. Modelos animales para el estudio de la alergia

A pesar de que no se conoce ningún animal de laboratorio que desarrolle de manera espontánea o inducida una enfermedad con la totalidad de las manifestaciones clínicas y los síntomas de la alergia, los ratones son el modelo más utilizado para el estudio de la enfermedad, de los mecanismos que la producen y de su tratamiento.

Además de ratones, otros modelos animales como ratas, cobayas, perros y ovejas pueden ser útiles para el estudio de la alergia (Karol, 1994; Zosky y Sly, 2007). Los dos últimos son especialmente interesantes ya que se sensibilizan de manera natural al entrar en contacto con algunos alérgenos comunes a humanos como *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Ascaris suum* (de Weck *et al.*, 1997).

En ratones, la exposición a alérgenos induce la producción de anticuerpos específicos asociados con el desarrollo de respuestas cutáneas de hipersensibilidad de tipo I (Karol, 1994). La importancia del fenotipo Th2 en las enfermedades alérgicas ligado a la producción de las citoquinas IL-4, IL-5, e IL-13 fue identificada en estos animales (Muller *et al.*, 1993; Brusselle *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1998; Hamelmann *et al.*, 1999; Shardonofsky *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003). Al igual que en humanos, el tipo de respuesta parece depender del genotipo de la cepa utilizada. Basándose en los niveles de IgE específicos, se han identificado cepas como altas (BALB/c y CBA) o bajas (C57BL/6 y SJL) respondedoras frente a determinados alérgenos (Herz *et al.*, 2004). Todas las cepas presentan desgranulación de mastocitos activada por la unión de IgE a mastocitos vía Fc ϵ RI, sin embargo, el componente inflamatorio de la respuesta tardía y su severidad varían entre las diferentes cepas. En general, los ratones BALB/c se consideran el modelo preferente para el estudio de hipersensibilidad a nivel pulmonar (Mayr *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2007) y han sido utilizados como modelo en estudios sobre la modulación de la respuesta alérgica (KleinJan *et al.*, 2006; Kim y Yeo, 2007) y en ensayos de inmunoterapia específica (Vrtala *et al.*, 1998; Brimnes *et al.*, 2007; Hisbergues *et al.*, 2007).

1.2. Los ácaros domésticos

Las primeras alusiones a los efectos dañinos del polvo doméstico datan del siglo XVIII. El médico británico Sir John Floyer escribe, en su *Tratado sobre asma* que “todos los asmáticos eran ofendidos por la mínima cantidad de polvo levantada al barrer una habitación o hacer una cama” (Nadchatram, 2005). Sin embargo no es hasta 1964 cuando el grupo de Voorhorst prueba que el componente alergénico del polvo doméstico es el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Voorhorst et al., 1964).

Los ácaros son artrópodos quelicerados del orden *Acariformes*, del que se han descrito más de 40.000 especies (Arlian y Platts-Mills, 2001; Nadchatram, 2005). Son organismos que destacan por la gran diversidad de hábitat que ocupan, desde el fondo de las fosas marinas hasta las nieves perpetuas o los folículos pilosos de mamíferos. Se alimentan de plantas, hongos, algas, materia orgánica, desechos animales o parasitando el exterior y el interior de insectos, reptiles, aves y mamíferos.

Se consideran ácaros domésticos a todos aquellos que se alimentan de restos humanos (ácaros del polvo doméstico, familia *Pyroglyphidae*) o de restos de otras especies que puedan encontrarse en el ámbito doméstico (ácaros de almacén o de productos almacenados, familias *Glycyphagidae*, *Acaridae* y *Chortoglyphidae*). El contacto directo o la inhalación de ácaros vivos o muertos, heces y otros restos pueden sensibilizar e inducir rinitis perenne, asma o dermatitis atópica en un gran número de pacientes alérgicos. La alergia a los ácaros domésticos es la segunda causa más frecuente de enfermedades alérgicas respiratorias y es responsable del 80% de las alergias al polvo doméstico (Wharton, 1976).

1.2.1. Biología y ciclo de vida

Los ácaros del polvo doméstico se alimentan principalmente de escamas humanas (Nadchatram, 2005). Un adulto libera diariamente entre 0.5 y 1.5 g de escamas y es capaz de mantener una población alérgicamente relevante (Nadchatram, 2005). Su ciclo de vida comprende 5 estados (huevo, larva, protoninfa, tritoinfa y adultos) (Arlian y Platts-Mills, 2001). El periodo quiescente de la protoninfa puede ser de larga duración ya que es resistente a la desecación y es el que permite a los ácaros sobrevivir a largos periodos en ausencia de humedad. La duración del ciclo es altamente variable, dependiendo principalmente de las condiciones de humedad y temperatura de su hábitat.

Los microhábitat donde los ácaros se encuentran en el ámbito doméstico no son de temperatura ni de humedad relativa uniforme; la temperatura puede fluctuar durante periodos cortos dentro de un mismo microhábitat. De esta forma, el desarrollo en lugares

de baja temperatura (suelo) es más lento comparado con su desarrollo en lugares más cálidos (sábanas o sofás). La duración del ciclo de huevo a adulto de *D. pteronyssinus* se estima en torno a 122 días a 16°C (y 75%HR) mientras que a 35°C se reduce a 15 días (Arlian y Platts-Mills, 2001; Nadchatram, 2005).

Los ácaros domésticos no habitan exclusivamente en el ambiente doméstico (sic). Los ácaros del polvo doméstico se encuentran también en nidos de pájaros y los de almacén en la hojarasca del suelo (normalmente asociados a insectos y pequeños mamíferos) y en nidos de mamíferos. No existen especies exclusivas de las casas humanas, pero todos los hábitat comparten condiciones de temperatura y humedad relativa elevadas. En estos hábitat también destaca la abundancia de alimento formada por restos de comida de animales, excreciones y secreciones (heces, escamas de la piel, aceites...), hongos y bacterias.

En el hogar, se distribuyen principalmente donde haya tejidos (ropa, fundas, peluches) o restos de ellos. Así, los ácaros domésticos se encuentran en camas, dormitorios, alfombras y algunos muebles (sofás, sillas tapizadas...).

1.2.2. Especies de relevancia alérgica y distribución

Los ácaros del polvo doméstico pertenecen a la familia *Pyroglyphidae*. Esta familia comprende 16 géneros y al menos 46 especies, de las cuales 13 se encuentran habitualmente en el polvo doméstico. De estas 13, las responsables de la mayoría de las sensibilizaciones son *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, y en menor medida, *Euroglyphus maynei*. En climas templados, los ácaros del polvo doméstico (suborden *Astigmata*, familia *Pyroglyphidae*) son una de las fuentes alérgicas más importantes en el ambiente doméstico.

D. pteronyssinus es la especie más abundante en Europa, América del Norte y del Sur, África y Oceanía. Es prácticamente la única especie que se encuentra en el Reino Unido (Hart y Whitehead, 1990), Australia (Green *et al.*, 1986; Colloff *et al.*, 1991), y Nueva Zelanda (Martin *et al.*, 1997). *D. pteronyssinus* y *D. farinae* eran conocidos comúnmente como ácaro europeo y americano respectivamente, pero esta denominación ha demostrado ser errónea ya que se ha comprobado que, salvo en algunas regiones de la costa este de Estados Unidos, *D. pteronyssinus* es la especie prevalente América (Arlian *et al.*, 1992; Huss *et al.*, 2001). En Europa sólo en Suecia, Polonia y algunas regiones de Italia es más frecuente *D. farinae* (Zock *et al.*, 2006).

Un estudio reciente hecho en España (Iraola y Fernández-Caldas, 2005), demuestra que en el 78% de los hogares analizados se detectan ácaros y *D. pteronyssinus* es la

especie más abundante, encontrándose en el 66% de las muestras. En zonas costeras la prevalencia de *D. pteronyssinus* sobrepasa el 90%, sin embargo en el interior disminuye hasta el 17% (Sastre *et al.*, 2002).

1.2.3. Alérgenos descritos

El único requerimiento para que un antígeno sea considerado como alérgeno es que una IgE en sueros de al menos el 5% de los pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* testados. Actualmente 19 alérgenos de *D. pteronyssinus* están reconocidos en la base de datos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS), de los cuales sólo dos (Der p 1 y Der p 2) son considerados alérgenos mayores (unen IgE en más del 50% de los pacientes). Estos dos alérgenos son responsables del 40-60% de los títulos en pacientes alérgicos (Thomas *et al.*, 2007).

Der p 1 fue el primer alérgeno clonado, secuenciado y expresado en forma de proteína recombinante (Chua *et al.*, 1988). Es una cisteín-proteasa de la misma familia que la papaína y la cathepsina L (Chua *et al.*, 1988). Es producido en el intestino y expulsado en las heces de los ácaros. Más del 99% de Der p 1 encontrado en el polvo doméstico proviene de las heces y no de los cuerpos de los ácaros (Tovey *et al.*, 1981). Es reconocido por IgE en el 88-100% de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (Stewart *et al.*, 1988; Yeoh *et al.*, 2003; Hales *et al.*, 2006; Liebler *et al.*, 2007) y tiene una identidad de secuencia del 85% con sus homólogos dentro de la familia *Pyroglyphidae*. Es un alérgeno muy polimórfico, del que se han descrito 23 variantes, con sustituciones en 18 de los 221 residuos de su secuencia (Piboonpocanun *et al.*, 2006).

Der p 2 fue también de los primeros alérgenos en ser clonado (Chua *et al.*, 1990), aunque su función no está clara todavía. Por homología estructural se asocia este alérgeno con la familia de proteínas de unión a lípidos con dominio ML. Esta familia incluye a las proteínas Niemann-Pick de tipo C2 (NPC2), cuya deficiencia se asocia con fallos en el transporte lipídico lo cual sugiere que Der p 2 pueda tener funciones similares (Thomas *et al.*, 2007). En diversos estudios se ha encontrado que es reconocido por un 75-100% de los sueros de pacientes con alergia a ácaros del polvo doméstico (Calkhoven *et al.*, 1991; Tame *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; Westritschnig *et al.*, 2003a).

La tropomiosina de *D. pteronyssinus* también es un alérgeno relevante (Der p 10), no sólo por su alergenicidad (reconocido por 6-55% de pacientes sensibilizados (Westritschnig *et al.*, 2003b; Hales *et al.*, 2006; Hales *et al.*, 2007)) sino por su alta identidad de secuencia con ácaros de la familia *Glycyphagidae* (96%), crustáceos (80%), insectos (75%) e incluso humanos (50%) (Asturias *et al.*, 1998; Pittner *et al.*, 2004). Este hecho hace que Der p 10 tenga una reactividad cruzada con pacientes alérgicos a cucarachas y gambas, complicando el diagnóstico de la alergia a los tres grupos de artrópodos (crustáceos, insectos y ácaros) dado el alto número de falsos positivos que produce.

Un resumen de las características principales del resto de alérgenos de *D. pteronyssinus* se puede ver en la tabla 2.

Tabla 2. Alérgenos de *D. pteronyssinus*

| Alérgeno | Tipo de Proteína | Peso Molecular (kDa) | Observaciones |
|-----------------|---|----------------------|--|
| Der p 1 | Cisteín-proteasa | 24 | Alérgeno Mayor, Reactividad Cruzada: Familia <i>Pyroglyphidae</i> |
| Der p 2 | Familia de unión a lípidos con dominio ML | 15 | Alérgeno Mayor, Reactividad Cruzada: Familia <i>Pyroglyphidae</i> |
| Der p 3 | Tripsina | 31 | - |
| Der p 4 | α -amilasa | 60 | 50% homología con amilasa de humano |
| Der p 5 | Desconocida | 14 | - |
| Der p 6 | Quimiotripsina | 25 | - |
| Der p 7 | Desconocida | 26, 30,31 | Altamente glicosilado |
| Der p 8 | Glutación S-transferasa | 27 | Reactividad cruzada: Cucaracha Americana |
| Der p 9 | Serín proteasa Colagenolítica | 29 | - |
| Der p 10 | Tropomiosina | 36 | Reactividad cruzada: Gambas, Cucarachas |
| Der p 11 | Paramiosina | 103 | - |
| Der p 13 | Proteína de unión a ácidos grasos | 15 | Alergenicidad baja |
| Der p 14 | Apolipoforina | 177 | Degradación en extractos |
| Der p 15 | Quitinasa | 98-106 | Altamente glicosilado |

1.3. Inmunoterapia específica con alérgenos de *D. pteronyssinus*

A pesar de ser la segunda causa más importante de alergias respiratorias (Wharton, 1976), los primeros ensayos clínicos de inmunoterapia con alérgenos de ácaros no tienen lugar hasta 1971 (Maunsell *et al.*, 1971; Smith, 1971), 60 años después de los experimentos de Noon. Hasta ese momento, la inmunoterapia para la alergia al polvo doméstico se realizaba con extractos de polvo con un contenido acarológico muy bajo y, por lo tanto, de eficacia muy reducida (Forgacs y Swan, 1968). Este retraso se debe a que hasta 1968 no se confirma que los ácaros son el componente alérgico del polvo (Voorhorst *et al.*, 1964).

Desde entonces, la SIT que utiliza extractos de *D. pteronyssinus* ha demostrado seguridad y efectividad en numerosos ensayos clínicos, en su mayor parte efectuados con extracto nativo adsorbido a AIOH (Fernández-Caldas *et al.*, 2006). Los tratamientos han demostrado ser duraderos (los beneficios persisten hasta 10 años después de su finalización) (Cools *et al.*, 2000), modifican las respuestas inflamatorias (Olsen *et al.*, 1997; Oehling *et al.*, 1998; Wuthrich *et al.*, 2001; Varney *et al.*, 2003), reducen la activación de eosinófilos (Wang *et al.*, 2006), aumentan los niveles de IgG4 (Oehling *et al.*, 1998; Wuthrich *et al.*, 2001), y disminuyen la respuesta de linfocitos T CD4⁺ de fenotipo Th1 y Th2 (O'Brien *et al.*, 1997). Sin embargo, no se han apreciado reducciones en los niveles de IgE específica, salvo después de varios años de inmunoterapia (Mastrandrea *et al.*, 1997).

1.3.1. Extractos de alérgenos modificados

A pesar de que se ha demostrado que la inmunoterapia específica es la única manera de modificar la respuesta inmune frente a alérgenos, y que su aplicación mejora la calidad de vida de los pacientes (Abramson *et al.*, 1999), es necesario mejorar su eficacia y reducir los efectos secundarios que provoca (Akdis y Blaser, 2000). El aumento de eficacia del tratamiento puede depender de una mejor estandarización de los extractos utilizados y de un aumento en la dosis de alérgeno inoculado. Este último factor coincide con el aumento de los efectos secundarios asociados con la SIT (posibilidad de sensibilización múltiple y choque anafiláctico). El uso de alérgenos cuya reactividad con IgE está alterada (hipoalergénicos) permite un aumento de la dosis sin aumentar el riesgo de anafilaxis (Marsh *et al.*, 1970; Maasch y Marsh, 1987; Akdis y Blaser, 2000; Valenta, 2002; Larche *et al.*, 2006).

Actualmente existen dos estrategias con enfoques muy distintos para conseguir variantes hipoalergénicas. En los últimos años las técnicas de biología molecular han

permitido la producción de alérgenos recombinantes con mutaciones en los sitios claves de unión a IgE, reduciendo su alergenicidad a la vez que se mantienen los epítopos T necesarios para modular la respuesta en individuos alérgicos e inducir tolerancia (Valenta y Kraft, 2002). A pesar de lo prometedores que parecen los resultados obtenidos hasta ahora, su aplicación clínica generalizada está muy distante, ya que para que sea efectiva una inmunoterapia con alérgenos recombinantes modificados es necesario conocer el repertorio completo alergénico de la especie que se está estudiando, mapear los epítopos E en todas las proteínas que lo componen y describir el panel completo de alérgenos a los que reacciona el paciente. La complejidad de este proceso se multiplica sobre todo en especies con un repertorio amplio de alérgenos como *D. pteronyssinus*, en el que hasta el momento se han descrito 19 alérgenos (Thomas *et al.*, 2007).

La alternativa al uso de alérgenos recombinantes consiste en el uso de extractos alergénicos químicamente modificados (alergoides). Esta idea, sugerida por Marsh en 1970 implica la polimerización de las proteínas presentes en los extractos mediante el tratamiento con glutaraldehído formando agregados solubles de alto peso molecular. Estos extractos polimerizados son hipoalergénicos (presentan una capacidad de unión específica a IgE reducida) y mantienen su inmunogenicidad (Marsh *et al.*, 1970; Maasch y Marsh, 1987).

El aumento de eficacia de los extractos polimerizados no solo puede deberse a la posibilidad de usar dosis mayores, sino que también afectan a su presentación antigénica. La polimerización produce cambios estructurales notables en los extractos y probablemente también en las proteínas que conforman el extracto, reduciendo su reconocimiento o presentación mediado/a por IgE. La hipótesis más común es que estos cambios que generan polímeros de alto peso molecular favorecen la endocitosis por parte de células dendríticas, macrófagos y linfocitos B (Figura 4) (Akdis y Blaser, 2000), facilitando una respuesta T_{reg} -Th1.

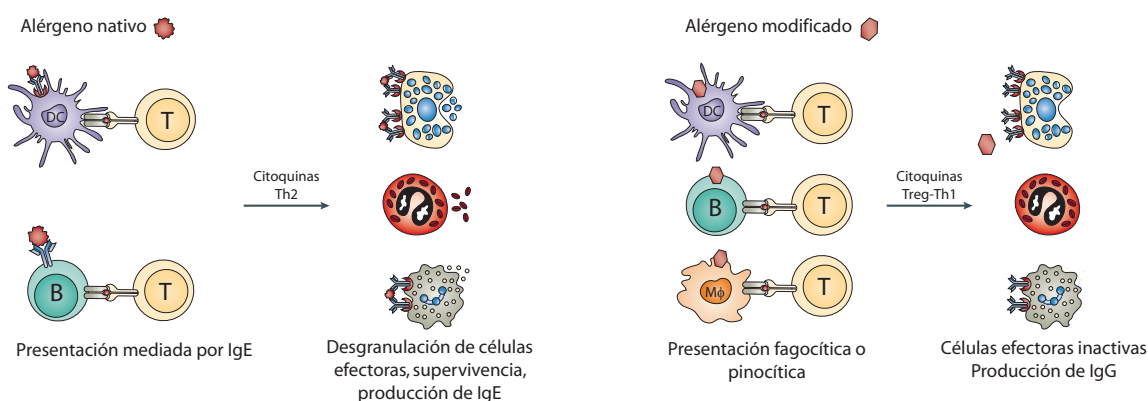


Figura 4. Diferencias entre las vías de presentación entre alérgenos en estado nativo y modificados

Otro inconveniente de utilizar extractos alergénicos de origen natural radica en que no sólo contienen proteínas, sino que también pueden contener pigmentos y otras sustancias irritantes o incluso tóxicas que son potencialmente dañinas, sobre todo cuando se inmuniza con elevadas dosis de extractos polimerizados. Para descartar esta posibilidad se han desarrollado métodos de despigmentación, que utilizan extractos alergénicos de origen vegetal, que no sólo eliminan pigmentos y sustancias alergénica e inmunológicamente no relevantes, sino que también anulan la actividad enzimática, favorecen la polimerización y mejoran la solubilidad de los alergoides (Berrens, 1994). Este método también es utilizado para despigmentar extractos provenientes de fuentes tan diversas como epitelio de gato, esporas de hongos y ácaros (Berrens, 1994).

Los extractos despigmentados y polimerizados de *D. pteronyssinus* han demostrado ser de alergenicidad reducida en pruebas cutáneas (Casanovas *et al.*, 2005b), son seguros a dosis diez veces mayores que las utilizadas con extractos nativos (Sager y Renner, 2004; Casanovas *et al.*, 2005a; Casanovas *et al.*, 2007), y han demostrado ser eficaces reduciendo tanto la carga sintomática en pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma como la necesidad de medicación (Sager y Renner, 2004; Ameal *et al.*, 2005; Garcia-Robaina *et al.*, 2006).

1.3.2. Uso de adyuvantes como inmunomoduladores durante la inmunoterapia específica

Los adyuvantes (del latín *adjuvare*, ayudar) son compuestos que aumentan y/o modulan la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno. Para que una vacuna sea efectiva, no sólo ha de contener los epítopos (B o T) adecuados sino que también debe generar una respuesta inmune protectora. En el caso de la alergia, esta respuesta implica la despolarización hacia una respuesta de tipo T_{reg} -Th1 frente a un antígeno que por sí mismo induce una respuesta Th2 de manera natural en el paciente. Como ya se ha dicho, esta modulación de la respuesta se puede conseguir de distintas formas: mediante la modificación de extractos alergénicos y alérgenos recombinantes o aumentando la dosis a utilizar. Una tercera vía que complementa las anteriores es el uso de adyuvantes.

El término adyuvante engloba a un grupo muy heterogéneo de compuestos que mejoran la eficacia de las vacunas influyendo o controlando distintos parámetros de la respuesta inmune (Hunter, 2002):

- Actúan sobre la producción de anticuerpos modificando su especificidad, título, afinidad, duración de la respuesta, memoria, distribución de subclase y cambio de isotipo

- Regulan la inmunidad mediada por células, a nivel de linfocitos CD4+ y CD8+
- Favorecen la actividad protectora en tejidos mucosos
- Disminuyen la incidencia de no-respondedores o respondedores débiles
- Rebajan la dosis necesaria de antígeno para conseguir respuesta

Sus mecanismos de acción son también muy variados: incrementan la infiltración celular, actúan sobre el tráfico celular al lugar de la inoculación, promueven la activación de células presentadoras, aumentan la presentación antigénica e inducen la liberación de citoquinas.

La elección de un adyuvante adecuado depende del tipo de respuesta protectora que interesa a la hora de evaluar una vacuna. En el caso de la alergia, el adyuvante ideal debería favorecer una respuesta Th1 que contrarreste la polarización hacia Th2 inducida naturalmente por el alérgeno utilizado.

Paradójicamente, el único adyuvante utilizado con éxito en SIT con alérgenos de *D. pteronyssinus* ha sido el hidróxido de aluminio (un adyuvante Th2) aunque se está evaluando la seguridad en ensayos preclínicos de otros adyuvantes Th1-T_{reg} como el monofosforil lípido A (Baldrick *et al.*, 2001) o los motivos CpG bacterianos (Mo *et al.*, 2006).

El hidróxido de aluminio es actualmente el único adyuvante aprobado para uso en humanos (Hunter, 2002). Induce respuestas Th2, pero no actúa sobre la respuesta celular. Su actividad biológica viene dada por las siguientes características:

- Forma un depósito de antígeno en los tejidos que favorece la exposición prolongada
- Da lugar a antígenos particulados facilitando su presentación
- Activa el complemento y estimula macrófagos para inducir la retención y activación de linfocitos en nódulos linfáticos

Las secuencias inmunoestimuladoras con motivos CpG son adyuvantes muy potentes que inducen una respuesta Th1 mediada por la producción de IFN e IL-12 (Heeg *et al.*, 2008). Esta capacidad convierte a los motivos CpG en un adyuvante ideal para la inmunoterapia específica. Sus efectos se han comprobado en ensayos con distintos

modelos animales (Broide *et al.*, 1998; Kohama *et al.*, 1999; Tighe *et al.*, 2000; Horner y Raz, 2002; Hussain *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2006) y su aplicación en humanos está siendo investigada (Tulic *et al.*, 2004).

El potencial inmunoestimulador de los motivos CpG se debe a su capacidad para activar diferentes tipos celulares después de su reconocimiento por el TLR9 (del inglés *Toll-like Receptor*) de las células dendríticas plasmacitoides (pDC) (Heeg *et al.*, 2008). Este reconocimiento activa a las pDC, incrementando expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y de las moléculas de superficie CD40, CD80, CD86 y CD54. También induce la producción de TNF- α , IFN- α , IL-6 e IL-8. En ratón, cuyos monocitos expresan TLR9, los motivos CpG activan directamente NF κ B, induciendo la expresión de TNF- α .

Objetivos

2. Objetivos

Actualmente, el único tratamiento capaz de mejorar la calidad de vida de los pacientes alérgicos modificando el desarrollo de la respuesta inmune que conduce a la enfermedad es la inmunoterapia específica. Este tipo de tratamiento se basa en la administración de dosis crecientes de los alérgenos en cuestión con objeto de inducir tolerancia en el individuo. La hipótesis más común es que el éxito de una terapia de inmunización dependerá principalmente de la reversión de la polarización Th2 típica que tiene lugar durante una respuesta alérgica hacia un fenotipo T_{reg} -Th1 (Akdis y Blaser, 2000). Tradicionalmente, esta reversión se ha conseguido mediante la administración de dosis muy elevadas de alérgeno, con el consiguiente riesgo de la generación de una respuesta exacerbada que conduzca a un choque anafiláctico para el paciente.

Objetivos

En la última década se han desarrollado varias alternativas capaces de mejorar la seguridad y eficacia de la inmunoterapia tradicional. Estas alternativas se centran principalmente en la administración de vacunas cuyo principio activo presente una capacidad de unión a IgE disminuida, bien sea mediante la utilización de alérgenos recombinantes en los que se ha modificado la unión a IgE o mediante la modificación química de extractos alergénicos. La seguridad y eficacia de estos extractos alergénicos químicamente modificados ha sido demostrada en múltiples ensayos clínicos (Baldrick et al., 2001; Ameal et al., 2005; Casanovas et al., 2005a; Fernández-Caldas et al., 2006; Garcia-Robaina et al., 2006; Casanovas et al., 2007; Wurtzen et al., 2007).

El papel del adyuvante utilizado también puede ser fundamental para mejorar la eficacia de la inmunoterapia específica. Actualmente el único adyuvante cuyo uso está autorizado para su uso en humanos es el AIOH, un adyuvante de tipo Th2. Los oligonucleótidos con motivos CpG promueven respuestas de tipo Th1 (Tighe et al., 2000) y se pueden considerar como una alternativa sólida al uso de los adyuvantes clásicos.

El objetivo de esta tesis es realizar un estudio de la respuesta inmune frente a extractos nativos, despigmentados y polimerizados de *D. pteronyssinus* en un modelo de ratones BALB/c. También se pretende analizar la capacidad inmunoestimuladora e inmunomoduladora que dos adyuvantes de naturaleza distinta, el AIOH (un adyuvante que promueve respuestas de tipo Th2) y los motivos CpG (promovedores de respuestas de tipo Th2) tienen sobre esta respuesta. Para ello, este trabajo se centrará en analizar los siguientes aspectos:

- Caracterización de la respuesta humoral frente a los tres extractos de *D. pteronyssinus* en presencia y ausencia de ODNs con motivos CpG o AIOH.
- Análisis de la producción de citoquinas tras la estimulación in vitro de esplenocitos provenientes de animales de animales inmunizados con las distintas formulaciones.
- Estudio de la variación de las poblaciones celulares generada tras la inmunización con los extractos en combinación con los distintos extractos.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos y soluciones.

Los principales reactivos empleados fueron suministrados por Nordic (Tilburg, Holanda), Roche (Basilea, Suiza), Boehringer (Ingelheim, Alemania), Merck (Whitehouse Station EE.UU.) y Sigma (Dorset, Reino Unido).

Los medios y soluciones más empleados se prepararon siguiendo los protocolos de Sambrook y colaboradores (2001).

3.2. Extractos de *D. pteronyssinus*

Se utilizaron tres tipos de extractos de *D. pteronyssinus*: extracto nativo, extracto despigmentado y extracto despigmentado polimerizado con glutaraldehído (extracto polimerizado). Todos los extractos fueron suministrados por Laboratorios LETI S.L. Una vez recibidos, se resuspendieron a una concentración de 20 mg de liofilizado/ml, se se filtraron usando para ello un filtro comercial de 0.2 μ m de diámetro y se guardaron en alícuotas a -70°C.

3.3. Electroforesis y cuantificación de proteínas

El estado de las proteínas purificadas se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), empleando el sistema Mini-Protean II de BioRad. Para ello las proteínas se desnaturalizan en tampón Laemmli (Laemmli, 1970) calentando durante cinco minutos a 95°C.

La separación va a tener lugar en función del tamaño de las proteínas analizadas. La visualización de las mismas se lleva a cabo por tinción con azul de Coomasie (Pallas *et al.*, 1986). La cuantificación proteica se realiza empleando el método de Bradford (Bradford, 1976) usando como reactivo el que suministra BioRad (Coomasie G-250 en ácido fosfórico y metanol) y por espectrofotometría midiendo absorbancia a 280nm.

3.4. Animales de experimentación.

Los ratones empleados en este estudio fueron suministrados por Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, España).

Para las inmunizaciones se utilizaron ratones hembra de 8 semanas de edad pertenecientes a la cepa BALB/c.

3.5. Adyuvantes empleados en las inmunizaciones.

Se inocularon los extractos de *D. pteronyssinus* adsorbidos a Hidróxido de Aluminio (Pierce) o combinados con el oligonucleótido con secuencias CpG 5'- TCGTCGTTAACGTTGTCGCCTT-3'.

3.6. Pautas de inmunización y obtención de sueros.

Las inoculaciones se llevaron a cabo en la almohadilla plantar. Se suministran tres dosis de extracto, a no ser que se indique lo contrario, espaciadas 15 días.

Antes de cada inoculación y cinco días después de la última dosis se tomaron muestras de sangre de la vena facial. El suero se obtiene centrifugando la sangre extraída durante 15 min a 1.200g, se gliceroliza en una proporción 1:1 y se almacenan a -20°C.

3.7. Ensayos de E.L.I.S.A.

La medida de la reactividad de los diversos sueros frente a las diferentes proteínas, así como la determinación de los títulos de anticuerpos e isotipos, se cuantificó por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Para el ensayo se emplearon placas de 96 pocillos (Nunc, Tokio, Japón), que fueron saturadas durante toda la noche a 4°C con una solución de antígeno en PBS (9 µg de proteína por ml de PBS).

A continuación las placas son secuencialmente incubadas durante dos horas con 200 µl/ pocillo en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% y Tween 20 al 0.5% en PBS); durante dos horas con 100 µl/pocillo usando los sueros en solución de bloqueo a la dilución más adecuada para el análisis; durante una hora con 100 µl/pocillo añadiendo el segundo anticuerpo correspondiente conjugado con peroxidasa a la dilución indicada en cada caso. Todas estas incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente con agitación suave.

Entre cada una de las diferentes incubaciones se realizan tres lavados con una solución de PBS al 0.5% de Tween 20.

Los anticuerpos secundarios empleados fueron: anti-IgG de ratón a una dilución 1:2000 en solución de bloqueo; anti-IgG1 de ratón a una dilución 1:2000 en solución de bloqueo; anti-IgG2a de ratón a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Todos ellos suministrados por Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, Holanda). El revelado

se lleva a cabo usando 100µl/pocillo de ortofenilenediamina (OPD) como sustrato de la peroxidasa. La absorbancia se midió a 450 nm a los 30 minutos tras añadir la solución de OPD en un lector 2001 (Whittaker, Indiana, Estados Unidos).

3.8. Detección de niveles de IgE totales en sueros de ratones inmunizados

La detección por E.L.I.S.A. de los niveles de IgE específica para antígeno se ve dificultada por la baja relación IgE/IgG total en sueros de los animales inmunizados. Para la detección de los niveles de IgE totales se utilizó el sistema BD OptEIA™ *Mouse IgE ELISA Set* (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

3.9. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF

Para los ensayos de inmunodetección de antígenos inmovilizados, las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nylon Immobilon™-P (Millipore) utilizando el sistema de electrotransferencia en líquido de BioRad. Como tampón de transferencia se utilizó una solución compuesta por Tris-HCl 25mM pH 8,3, glicina 192mM y 20% de metanol. Tras la electrotransferencia, las membranas fueron bloqueadas en 5% (p/v) de leche desnatada y 0,5% Tween 20 en PBS un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente. Las incubaciones con los dos anticuerpos se realizaron en la solución de bloqueo. Los tiempos de incubación fueron de 2 horas para el anticuerpo primario y 1 hora para el secundario. Entre las distintas incubaciones se realizaron 3 lavados con 0,5% Tween 20 en PBS.

Como anticuerpo secundario se emplea un anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa (suministrado por Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos). La unión específica de los anticuerpos fue revelada con una solución cromogénica de Tetrametilbenzidina (Sigma).

3.10. Ensayos de inhibición de reactividad cruzada

Para hacer un análisis comparativo de la composición de anticuerpos en los sueros provenientes de las inmunizaciones con los distintos extractos se utilizó la técnica de E.L.I.S.A. descrita anteriormente. A diferencia de un ensayo de E.L.I.S.A. común, en este caso los sueros se preincubaron con cada uno de los extractos de *D. pteronyssinus* durante dos horas. Después de la preincubación, los sueros se incuban en placas de

96 pocillos que han sido previamente saturadas con el extracto correspondiente, o se incuban con membranas de PVDF a las que previamente se han transferido las proteínas provenientes del extracto nativo separadas en geles de SDS-PAGE.

La cantidad de extracto a utilizar durante la preincubación se determinó utilizando concentraciones crecientes de cada extracto preincubadas con el suero de los animales inmunizados con él mismo. Se consideró adecuada aquella concentración de extracto que lograba una disminución en la absorbancia mayor del 90% en comparación con la obtenida utilizando un suero sin preincubar.

3.11. Cuantificación de la expresión de citoquinas en sobrenadantes de cultivo

Se emplearon células obtenidas de bazo de ratones BALB/c. Las células se obtienen por maceración empleando para ello separadores celulares de nylon con un poro de 70µm (Becton Dickinson Labware). La suspensión celular se prepara con medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 440 µM L-alanina, 400µM L-asparagina, 399µM L-ácido aspártico, 343µM L-ácido glutámico, 0.01% estreptomycin, 102 U/ml penicilina, 50µg/ml gentamicina, 10 µM 2-mercaptoetanol. Tras realizar dos lavados, los eritrocitos se lisan resuspendiendo las células en tampón de lisis (150mM NH₄Cl, 10mM CO₃HK, 1mM EDTA pH 7.4) e incubándolas a 37°C durante dos minutos. Las células vivas de bazo se cuentan por exclusión con Azul Tripán al 2%.

Las células se distribuyen en placas de 24 pocillos (Nunc) a una concentración de 6x10⁶ células/ml en un volumen de 500µl.

Para la preparación de los estímulos, a excepción de la Concanavalina A (Con A) (Sigma) que se suministra en condiciones de esterilidad, los diferentes extractos se filtraron con un filtro Millex®-GS con un tamaño de poro de 0.22µm. Los estímulos se añaden a las células en un volumen de 100 µl a una concentración de 4 µg/ml (Con A) y 40 µg/ml (extractos nativo, despigmentado y polimerizado).

Las células en presencia del estímulo se incuban a 37°C con un 5% de CO₂. Los sobrenadantes del cultivo se recolectan transcurridas 48 horas, se distribuyen en alícuotas, y se liofilizan, almacenándose a -70°C hasta su uso.

La cuantificación de las diferentes citoquinas objeto de análisis se hizo con el sistema FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex (Bender MedSystems). El protocolo de trabajo se corresponde con las instrucciones y recomendaciones facilitadas por el fabricante.

3.12. Inmunodetección de proteínas de membrana mediante citometría de flujo.

Se estudia la variación en las poblaciones celulares por efecto de la inoculación con los distintos extractos con o sin los adyuvantes después de una primera dosis (días 2, 4, 7, 9 y 11) y después de la segunda dosis (días 14, 16, 18, 21, 23 y 24).

Para llevar a cabo ambos tipos de ensayos se emplean células del ganglio poplíteo ganglio drenante de ratones BALB/c.

La obtención de las células se realiza del mismo modo que en los ensayos de proliferación. Durante el proceso de tinción se emplea como medio PBS_s (PBS con el 1% de suero fetal bovino).

En cada tinción se emplean 10⁶ células que se distribuyen en placas de 96 pocillos de fondo cónico (Nunc). Se realizan tres lavados con 200 µl de PBS_s mediante centrifugaciones de 5 minutos a 1200 rpm. Finalmente las células se resuspenden en 100 µl de PBS_s.

A continuación se procede al bloqueo incubando las células durante 5 minutos en hielo en presencia de 1 µl/pocillo de F_c block (suministrado por Pharmingen). Posteriormente se añade 1 µl/pocillo del anticuerpo (CD4, CD8a, B220, CD69, CD11c, CD40) correspondiente conjugado con el fluorocromo (FITC ó PE) adecuado (Pharmingen) y las placas se incuban en hielo y protegidas de la luz un mínimo de 20 minutos.

Transcurrido este tiempo se realizan tres lavados con 200 µl de PBS_s. Las células se resuspenden PBS_s y se llevan a un volumen final de 500 µl para su posterior análisis.

El análisis se lleva a cabo en un citómetro FACScalibur de Becton Dickinson. Los resultados son presentados en forma de histogramas utilizando el programa FlowJo (Tree Star).

3.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de software Statistica 7.0 (StatSoft, E.E.U.U.). En primer lugar se hizo una prueba de normalidad y de homogeneidad de varianzas. En caso de cumplirse los requisitos necesarios, se procedió a realizar un análisis de varianza multifactorial seguido de pruebas *post hoc* Fisher LSD.

En los casos en los que no se cumplieron las condiciones de homogeneidad de varianza y/o normalidad, los análisis se hicieron utilizando estadística no paramétrica, concretamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de pruebas *post-hoc* U de Mann-Whitney.

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterización de los extractos de *D. pteronyssinus*

En todos los experimentos de esta tesis se utilizaron tres extractos liofilizados de *D. pteronyssinus*: un extracto Nativo (Lote 120-06/LN), un extracto Despigmentado (Lote 120/LD) y un extracto Polimerizado (Lote 136LP).

Durante el proceso de despigmentación, se descarta mediante diálisis una serie de pigmentos y otros compuestos no alergénicos menores de 5 kDa al mismo tiempo que se reduce la actividad enzimática del extracto. La fracción descartada se conoce como el Compuesto "C" del extracto. El extracto Polimerizado se obtiene mediante el tratamiento con glutaraldehído del extracto Despigmentado seguido de una diálisis para aislar los polímeros de alto peso molecular (>100 kDa).

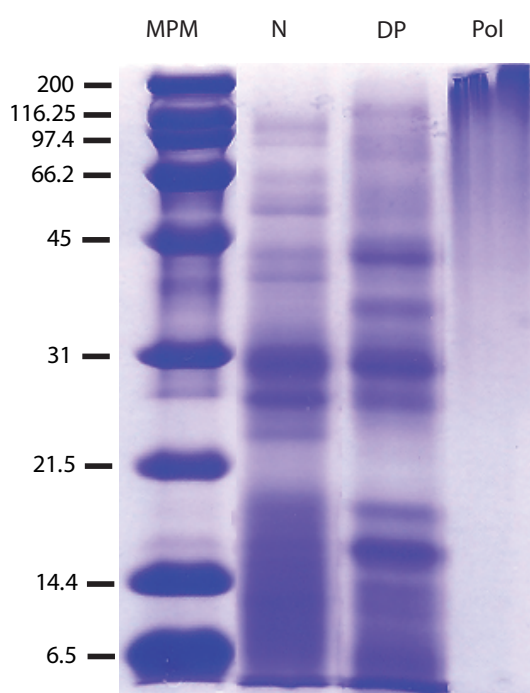


Figura 5. Análisis por SDS-PAGE de los tres extractos de *D. Pteronyssinus*. Se cuantificó el contenido proteico total de cada extracto por el método de Bradford y se cargaron 40µg de proteína por pocillo. MPM: Marcador de Peso Molecular; N: Extracto Nativo; DP: Extracto Despigmentado; Pol; Extracto Polimerizado.

Para su utilización en ensayos de inmunización, de proliferación y de viabilidad se tiene en cuenta la concentración de proteína total por microlitro de extracto resuspendido. Los valores obtenidos mediante el método de Bradford fueron de 9 µg/µl para el extracto nativo, 3.5 µg/µl para el despigmentado y 10 µg/µl para el polimerizado.

En la figura 5, se muestra un gel de SDS-PAGE al 12% en el que se cargaron 40 μg de proteína total de cada extracto por carril. Las bandas mayoritarias, así como el contenido proteico del extracto despigmentado son similares al extracto nativo. Las proteínas presentes en el extracto polimerizado al estar presentes en un polímero mayor de 100 kDa no pueden resolverse y se mantienen en el inicio de la corrida electroforética.

4.2. Inmunogenicidad de los extractos de *D. pteronyssinus*

4.2.1. Respuesta frente a extracto nativo en función de la dosis

Con el fin de estudiar la capacidad inmunogénica del extracto nativo se inocularon cuatro grupos de tres animales con dosis crecientes de 10, 20, 30 y 40 μg de proteína total del extracto nativo. Se administraron tres dosis por vía subcutánea en la almohadilla plantar en los días 0, 15 y 30. Los animales se sangraron cinco días después de la última dosis (día 35) y los sueros obtenidos se utilizaron para medir valores de IgG total específica para este extracto mediante la técnica de ELISA.

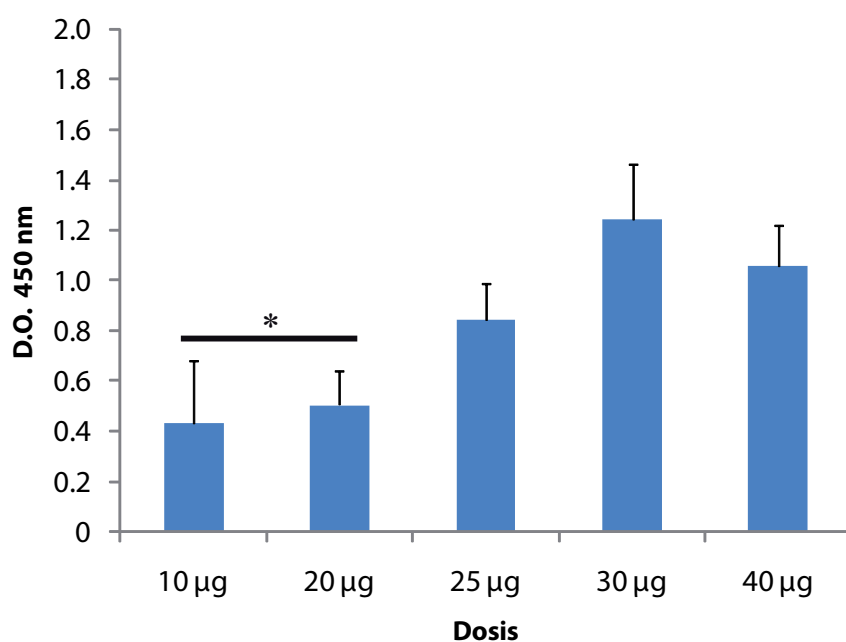


Figura 6. Respuesta IgG frente al extracto nativo en sueros de animales inoculados con distintas dosis de proteína total. Los sueros se testaron a 1/200 cinco días después de la tercera dosis. * Se encontraron diferencias significativas entre las dosis de 10 y 20 μg y las dosis de 25, 30 y 40 μg . Prueba de Kruskal-Wallis $H(4, N=17)=11.97908$ $p<0.05$ seguida de un análisis post-hoc mediante una U Mann-Whitney

La figura 6 muestra el promedio de la D.O. obtenida al medir los sueros en una dilución 1/200 de forma individual. Se observaron diferencias significativas en la inmunogenicidad del extracto nativo entre los grupos inoculados con 10 y 20 μg que respondieron de forma discreta (valores de D.O. de 0.43 y 0.50 respectivamente) pero positiva. La reactividad fue significativamente mayor a dosis mayores de 30 y 40 μg (1.25 y 1.06).

Vistas las diferencias cuantitativas al aumentar la dosis de 20 a 30 μg se tomó la decisión de inocular un quinto grupo de cuatro animales con una dosis intermedia de 25 μg . La respuesta IgG total obtenida en este grupo (Figura 6) mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos de los animales inoculados con 10 y 20 μg . Sin embargo, no se encontraron diferencias frente a los grupos inoculados con las dosis mayores (30 y 40 μg).

A la vista de estos resultados, se puede afirmar que la inmunogenicidad del extracto nativo es dependiente de la dosis, que la dosis de 25 μg es suficiente para suscitar una respuesta humoral significativa. El uso de dosis mayores no da como resultado una respuesta más elevada.

4.2.2. Inmunogenicidad de los extractos nativo despigmentado y polimerizado e inmunomodulación inducida por su inoculación en combinación con adyuvantes

Tabla 3

| Grupo | Extracto | Adyuvante |
|-------|---------------|---------------|
| 1 | PBS | Sin Adyuvante |
| 2 | Nativo | |
| 3 | Despigmentado | |
| 4 | Polimerizado | |
| 5 | PBS | CpG |
| 6 | Nativo | |
| 7 | Despigmentado | |
| 8 | Polimerizado | |
| 9 | PBS | AIOH |
| 10 | Nativo | |
| 11 | Despigmentado | |
| 12 | Polimerizado | |

El objetivo de este ensayo es, en primer lugar, evaluar la respuesta humoral en función del extracto utilizado. En segundo lugar, determinar si el uso de adyuvantes modifica la respuesta cuantitativa y/o cualitativamente. Para ello, se inocularon 16 grupos de cinco ratones con dosis de 25 μg de proteína total de cada extracto en ausencia de adyuvante y junto a CpG o AIOH según se muestra en la tabla 3. Se administraron tres dosis por vía subcutánea espaciadas 15 días. Cinco días después de la última dosis se tomaron muestras de sangre de los animales y los sueros obtenidos se utilizaron para su análisis por ELISA y *Western Blot*.

Reactividad IgG total frente al extracto nativo

La figura 7 muestra la media para cada grupo de los valores de D.O. medidos de forma individual en cada animal a una dilución 1/1000. Los tres extractos son inmunogénicos, independientemente del adyuvante que se utilice. El extracto despigmentado es el más inmunogénico de los tres analizados. Al emplear CpG como adyuvante, la respuesta obtenida en todos los casos aumenta, siendo este incremento más notable para el extracto polimerizado.

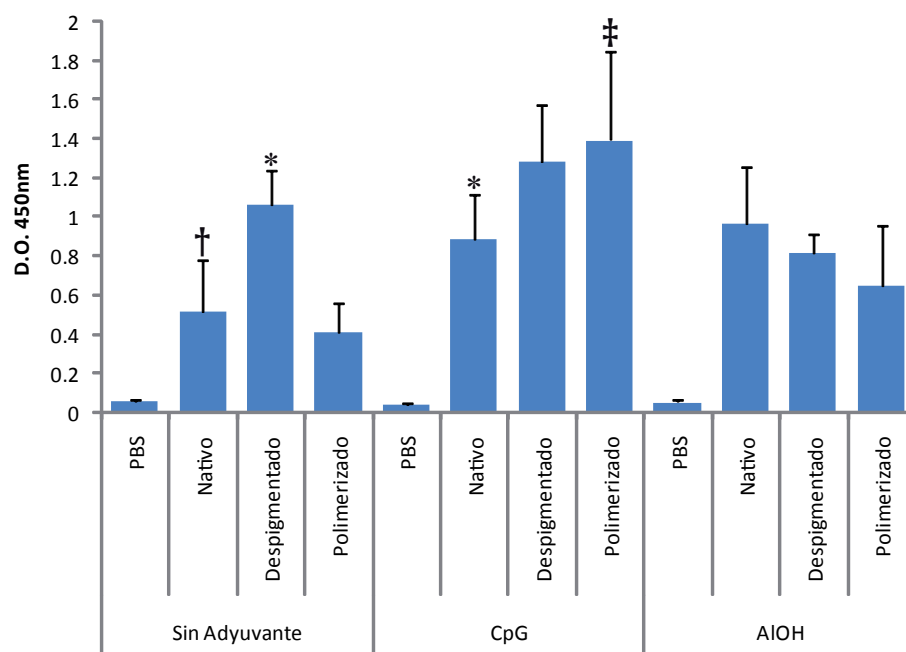


Figura 7. Reactividad IgG total. Respuesta IgG frente al extracto nativo en sueros de animales inoculados con extracto nativo, despigmentado y polimerizado en combinación con distintos adyuvantes. Los sueros se testaron a 1/1000 cinco días después de la tercera dosis. * Diferencias significativas entre extractos al utilizar el mismo adyuvante ($p < 0.05$). † Diferencias significativas entre adyuvantes al utilizar el mismo extracto ($p < 0.05$). ‡ Diferencias altamente significativas entre adyuvantes al utilizar el mismo extracto ($p < 0.001$).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza multifactorial tomando como factores de estudio el extracto y el adyuvante utilizado.

En la figura 8A se muestra el análisis de la respuesta según el extracto independientemente del adyuvante utilizado. Se aprecian diferencias significativas entre la reactividad de los sueros provenientes de animales inmunizados con extracto despigmentado y aquellos inmunizados con extracto nativo o polimerizado ($F(2, 35)=4.1432$, $p < 0.05$).

Al inmunizar los animales sin adyuvante (Figura 8C) se observa que el extracto despigmentado es el más inmunogénico, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) con el extracto nativo y altamente significativas ($p < 0.001$) con el polimerizado.

(Tabla 4). En el grupo inmunizado con el extracto polimerizado se apreció la menor reactividad (Figura 8C) aunque no se encontraron diferencias significativas con respecto al nativo.

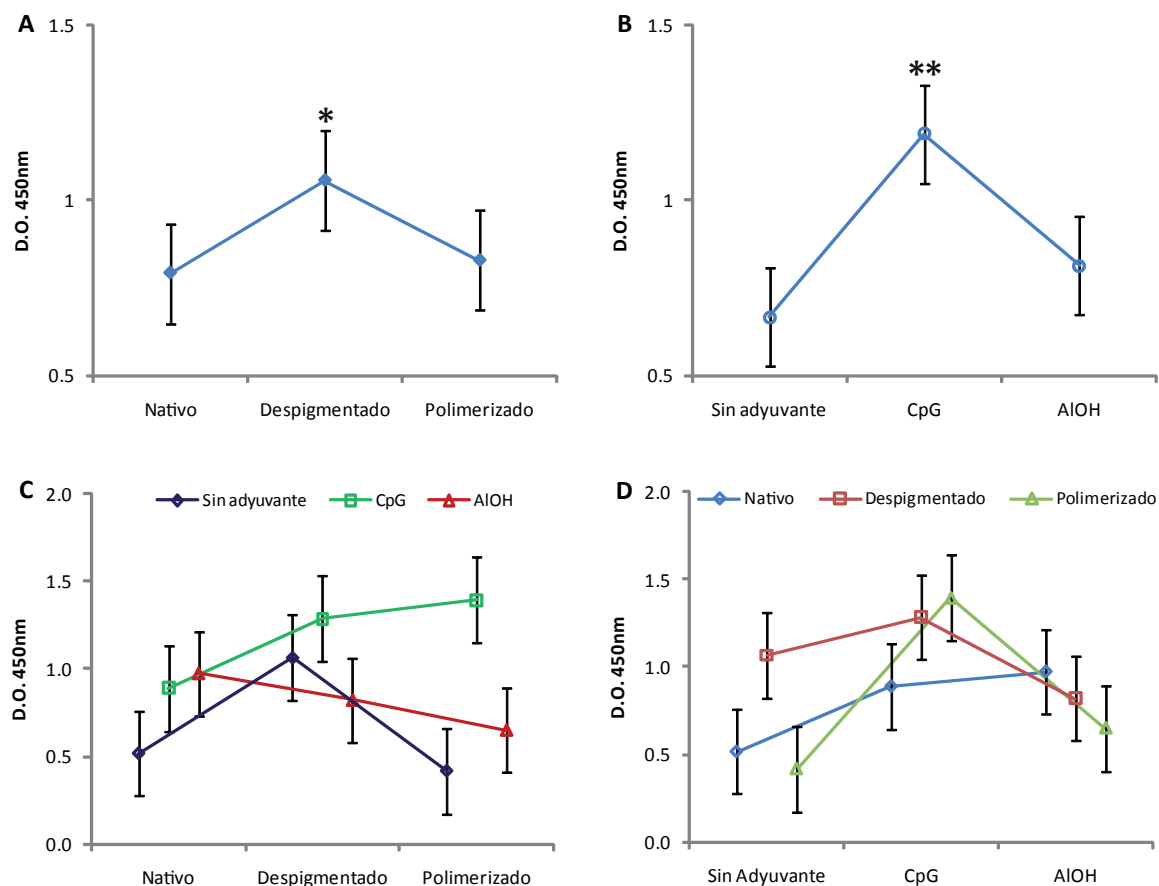


Figura 8. Análisis de varianza multifactorial de los niveles de IgG total. (A) Análisis de la respuesta según el extracto utilizado. (B) Análisis de la respuesta según el adyuvante utilizado. (C) Análisis de la respuesta según el extracto en función del adyuvante. (D) Análisis de la respuesta según el adyuvante en función del extracto. Las barras verticales denotan intervalos de confianza del 95%. * Diferencias significativas ($p<0.05$). ** Diferencias altamente significativas ($p<0.001$)

Cuando se utiliza CpG como adyuvante, la respuesta frente a los extractos despigmentado y polimerizado es significativamente más alta que la que se da al inocular el extracto nativo ($p<0.05$) (Tabla 4, Figura 8C). No se observaron diferencias significativas entre las reactividades IgG de los sueros procedentes de animales inmunizados con AIOH en función del extracto utilizado.

El análisis de la respuesta en función del adyuvante (independientemente del extracto utilizado) muestra que el CpG es el inductor de la respuesta IgG más fuerte y las diferencias con respecto a los animales inoculados sin adyuvante y a aquellos inoculados con el extracto adsorbido a AIOH son altamente significativas ($F(2, 35)=14.591$, $p<0.001$) (Figura 8B).

El uso de los adyuvantes CpG y AIOH junto al extracto nativo aumenta significativamente la reactividad IgG total con respecto a los animales a los que se les inoculó dicho extracto sin adyuvante ($p<0.05$) (Tabla 4, figura 8D). Si se analiza la respuesta frente al extracto despigmentado en función del adyuvante, se observan niveles altos de reactividad en los sueros de los grupos inoculados con este extracto sin adyuvante y en combinación con CpG. Esta reactividad desciende significativamente al inocular el extracto despigmentado adsorbido a AIOH. Finalmente, la respuesta IgG frente al extracto polimerizado es mayor cuando éste es inoculado con CpG; las diferencias con respecto a los grupos inoculados con extracto polimerizado sin adyuvante y con el extracto adsorbido a AIOH son altamente significativas.

| | | Sin adyuvante | | | CpG | | | AIOH | | |
|---------------|-----|---------------|----|-----|-----|----|-----|------|----|-----|
| | | N | DP | Pol | N | DP | Pol | N | DP | Pol |
| Sin adyuvante | N | | * | — | * | ** | ** | * | — | — |
| | DP | * | | ** | — | — | — | — | — | * |
| | Pol | — | ** | | * | ** | ** | * | * | — |
| CpG | N | * | — | * | | * | * | — | — | — |
| | DP | ** | — | ** | * | | — | — | * | ** |
| | Pol | ** | — | ** | * | — | | * | * | ** |
| AIOH | N | * | — | * | — | — | * | | — | — |
| | DP | — | — | * | — | * | * | — | | — |
| | Pol | — | * | — | — | ** | ** | — | — | |
| | | N | DP | Pol | N | DP | Pol | N | DP | Pol |
| | | Sin adyuvante | | | CpG | | | AIOH | | |

Tabla 4. Análisis *post-hoc* de la respuesta IgG frente al extracto nativo en sueros de animales inoculados con extracto nativo, despigmentado y polimerizado en combinación con distintos adyuvantes.

* Diferencias significativas ($p<0.05$). ** Diferencias altamente significativas ($p<0.001$). - No se encontraron diferencias

Modulación mediada por adyuvantes de la respuesta IgG1/IgG2a frente al extracto nativo

La figura 9 muestra la media para cada grupo de los valores de D.O. medidos de forma individual en cada animal a una dilución 1/500. Se calculó la relación IgG2a/IgG1 de forma individual.

En los ratones inoculados sin adyuvante, la respuesta es predominantemente de tipo IgG1 (extracto nativo: IgG2a/IgG1=0.40; despigmentado: IgG2a/IgG1=0.58; polimerizado: IgG2a/IgG1=0.14). Se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) al comparar la respuesta IgG2a/IgG1 obtenida mediante la inoculación de extracto despigmentado con la respuesta que induce el extracto polimerizado. Los niveles más altos

de reactividad para ambos subtipos se dieron en los animales inoculados con extracto despigmentado, y la reactividad IgG2a menor se observó en aquellos inoculados con extracto polimerizado.

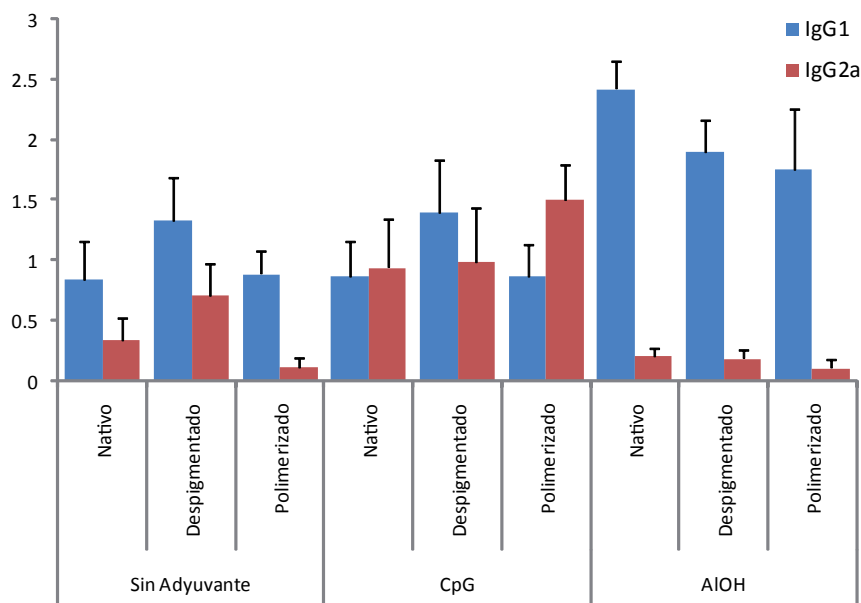


Figura 9. Tipo de respuesta IgG1/IgG2a. Respuesta frente al extracto nativo en sueros de animales inoculados con extracto nativo, despigmentado y polimerizado en combinación con distintos adyuvantes. Los sueros se testaron a 1/500 cinco días después de la tercera dosis.

La inoculación de los extractos adsorbidos a AIOH produce una respuesta con un claro carácter IgG1 en todos los casos (extracto nativo: $IgG2a/IgG1=0.09$; despigmentado: $IgG2a/IgG1=0.10$; polimerizado: $IgG2a/IgG1=0.06$). Esta polarización viene dada fundamentalmente por un incremento en los valores de IgG1 con respecto a los obtenidos sin adyuvante, aunque también se aprecia una disminución de los valores de IgG2a en los animales inoculados con extracto nativo y extracto despigmentado. La relación $IgG2a/IgG1$ menor se encontró al inocular el extracto polimerizado adsorbido a AIOH (diferencias significativas, $p<0.05$).

Al utilizar CpG como adyuvante se aprecia un efecto modulador de la respuesta IgG1 predominante observada en los casos anteriores. El extracto despigmentado mantiene el tipo de respuesta predominante IgG1 observado al inocularlo sin adyuvante, aunque con valores más cercanos a la unidad ($IgG2a/IgG1=0.75$), diferencias significativas con respecto al grupo inoculado con el extracto adsorbido a AIOH. La inmunización con extracto nativo produce una respuesta equilibrada ($IgG2a/IgG1=1.24$). Finalmente, los animales inoculados con el extracto polimerizado y CpG revierten por completo la

respuesta hacia IgG2a ($IgG2a/IgG1=1.80$). El cambio en el tipo de respuesta observado se debe al aumento en los niveles de IgG2a, estadísticamente significativo en el caso de los extractos nativo y polimerizado.

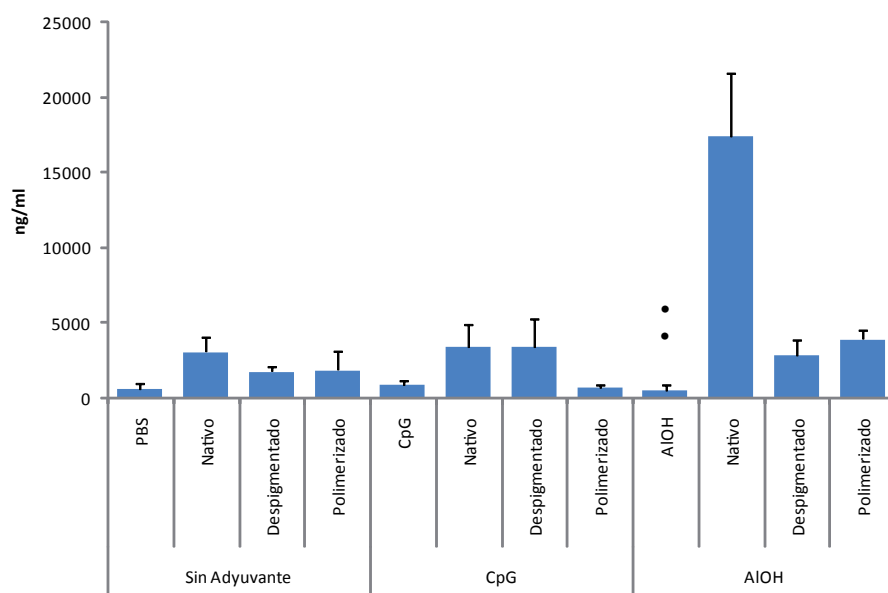


Figura 10. Niveles de IgE total. Concentración en sueros de animales inoculados con extracto nativo, despigmentado y polimerizado en combinación con distintos adyuvantes. Los sueros se testaron a 1/100 cinco días después de la tercera dosis.

Niveles totales de IgE

La detección de IgE específica de antígeno en ratones se ve dificultada por la baja relación IgE/IgG total. Se hicieron varios experimentos para eliminar los anticuerpos de tipo IgG mediante el empleo de proteína G, pero los resultados no fueron consistentes.

Por el contrario sí se pudieron cuantificar los niveles totales de IgE en el suero de los animales inmunizados. La figura 10 muestra la media para cada grupo de las concentraciones de IgE total en ng/ml medidas de forma individual en cada animal.

En los animales inoculados sin adyuvante, la concentración de IgE en suero más alta se observó en los animales inoculados con extracto nativo, apreciándose diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) con respecto a los extractos despigmentado y polimerizado. Al utilizar CpG como adyuvante, los valores mínimos de IgE total se dan en los ratones inoculados con extracto polimerizado (diferencias estadísticamente significativas con respecto a los extractos nativo y despigmentado). La inoculación de los extractos adsorbidos a AIOH produce aumentos significativos en los niveles de IgE en

los sueros de los animales inmunizados con extracto nativo en comparación con aquellos a los que se les inoculó extracto despigmentado y los inmunizados con extracto polimerizado.

El extracto nativo adsorbido a AIOH produjo los niveles más altos de IgE total (diferencias estadísticamente significativas con respecto a los inoculados sin adyuvante y con CpG). Sin embargo al usar CpG como adyuvante, no se encuentran diferencias significativas con respecto a los animales inoculados con extracto nativo sin adyuvante. Es importante señalar que en dos de los siete ratones inoculados con AIOH en ausencia de extracto, se observaron niveles de de IgE muy elevados y se consideraron estadísticamente como valores atípicos fuera de rango. Estos datos no fueron incluidos en el análisis de los datos.

En el caso del extracto despigmentado, el AIOH induce un aumento significativo en la concentración de IgE en suero con respecto a los animales inmunizados con el mismo extracto pero sin adyuvante. La utilización de CpG como adyuvante no induce diferencias significativas con respecto a los niveles de IgE.

Los niveles más bajos de IgE se observaron al inocular el extracto polimerizado sin adyuvante y con CpG, encontrándose diferencias significativas con respecto al grupo inmunizado con el extracto adsorbido a AIOH.

Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF

El objetivo de este experimento era establecer si existía un perfil antigénico específico para cada formulación. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos tras enfrentar los sueros provenientes de cada grupo con extracto nativo cargado en un gel SDS-PAGE y electrotransferido a una membrana de PVDF.

Se observa que tanto el extracto como el adyuvante utilizado influyen en la generación de los perfiles antigénicos. Al inocular los extractos adsorbidos a AIOH, los patrones de reconocimiento obtenidos parecen igualarse y las diferencias existentes entre extractos se minimizan. Los sueros provenientes de todas las formulaciones reconocieron bandas de aproximadamente 18, 25, y 30 kDa. Se observó también un patrón de reconocimiento intenso con dos bandas definidas en el rango de 130 a 205 kDa reconocido por los sueros provenientes de los nueve grupos.

Cabe destacar que en el patrón obtenido con los sueros provenientes de animales inoculados con extracto despigmentado en ausencia de adyuvantes se detectan dos bandas de reconocimiento muy definidas entre los 18 kDa y los 7 kDa y una tercera de

aproximadamente 42 kDa que están ausentes en los patrones obtenidos para el resto de los grupos. Al inocular este extracto en combinación con CpG o adsorbido a AIOH, los sueros correspondientes a estas formulaciones dejan de reconocer estas dos bandas.

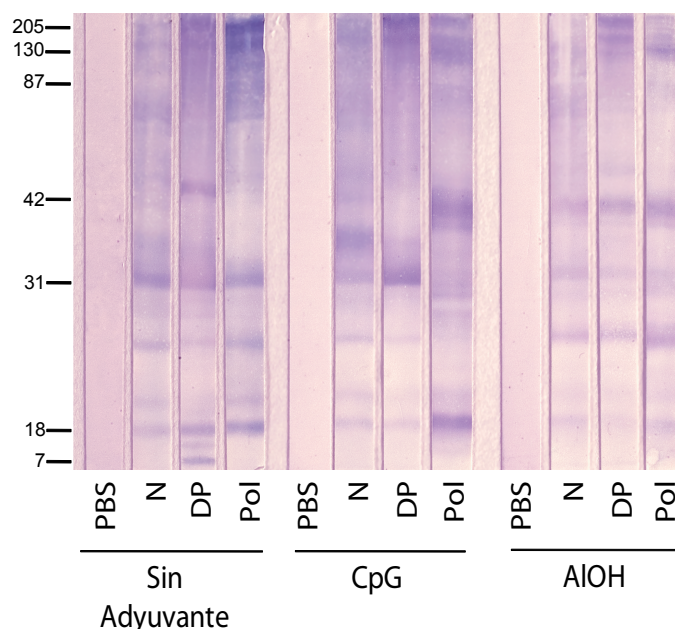


Figura 11. Perfiles antigénicos del extracto nativo. Los sueros de los animales se agruparon según la formulación administrada y se evaluó su reactividad IgG a una dilución 1/200. N: Suero proveniente del grupo de de animales inoculados con extracto Nativo; DP: Suero proveniente del grupo de animales inoculados con extracto Despigmentado; Pol: Suero proveniente del grupo de animales inoculados con extracto Polimerizado.

Ensayos de inhibición de reactividad cruzada

En estos ensayos se pretende averiguar si la despigmentación y subsiguiente polimerización del extracto nativo de *D. pteronyssinus* modifican el repertorio de anticuerpos generados. Para ello se evalúan las diferencias en reactividad IgG frente a los extractos nativo, despigmentado y polimerizado de los sueros de los animales inmunizados sin adyuvante al preincubarlos con cada uno de los extractos. Dada la gran cantidad de suero necesaria para realizar los experimentos de inhibición estos experimentos se realizaron agrupando los sueros pertenecientes a los animales inmunizados de cada grupo.

Se parte de la base de que si se preincuba el suero de un animal inmunizado con la cantidad suficiente del extracto con el que se le inmunizó y posteriormente se enfrenta en un ensayo de ELISA de nuevo al mismo extracto con el que se hizo la preincubación, la reactividad IgG de este suero debe disminuir considerablemente, hasta acercarse a los valores de sueros preinmunes. En este momento se considera que todas las IgG del suero específicas contra el antígeno están unidas al extracto.

La figura 12 muestra las curvas de saturación para cada uno de los sueros al preincubarlos con los extractos que se utilizaron para inmunizar a los ratones de los que se obtiene el suero y enfrentarlos en un ensayo de ELISA al mismo extracto con el que fueron preincubados. En los tres casos, concentraciones de 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína de cada extracto fueron suficientes para disminuir en más de un 90% la reactividad observada en los sueros sin preincubar. Se toma la decisión de utilizar 80 $\mu\text{g/ml}$ en los siguientes ensayos de inhibición, asegurando así la presencia de un exceso de proteína.

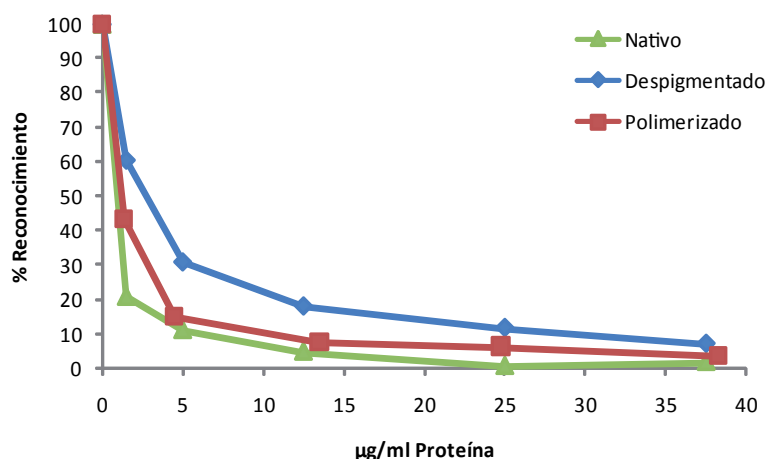


Figura 12. Curvas de saturación. Reactividad en % del suero nativo frente a extracto nativo (nativo), despigmentado frente a extracto despigmentado (despigmentado), y polimerizado frente a extracto polimerizado (polimerizado) al preincubarlos con concentraciones crecientes de extracto nativo, despigmentado y polimerizado respectivamente.

En cada ensayo se utilizaron los siguientes controles:

- Tres controles de reactividad de los sueros: suero proveniente de animales inoculados con extracto nativo sin preincubar (suero nativo), despigmentado sin preincubar (suero despigmentado) y polimerizado sin preincubar (suero polimerizado)
- Tres controles de inhibición: suero nativo preincubado con extracto nativo, suero despigmentado preincubado con extracto despigmentado y suero polimerizado preincubado con extracto polimerizado

Los resultados se muestran en porcentaje de reconocimiento con respecto al suero en cuestión sin preincubar.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la reactividad del suero nativo. Los tres controles de inhibición muestran la reactividad

esperada, por debajo de 10%. El suero nativo conserva un 15% de reactividad al ser preincubado con extracto despigmentado y un 48% al preincubarlo con extracto polimerizado. En el caso del suero despigmentado (Figura 13B), la preincubación con extracto nativo y polimerizado mantuvo los niveles de reactividad en un 15 y un 48% respectivamente, mientras que el control del suero polimerizado preincubado con extracto polimerizado conservó el 20% de reactividad. Finalmente, (Figura 13C), se observó que se conserva el 21 y el 19% de reactividad del suero de animales inoculados con extracto polimerizado al preincubarlo con extracto nativo y extracto despigmentado respectivamente.

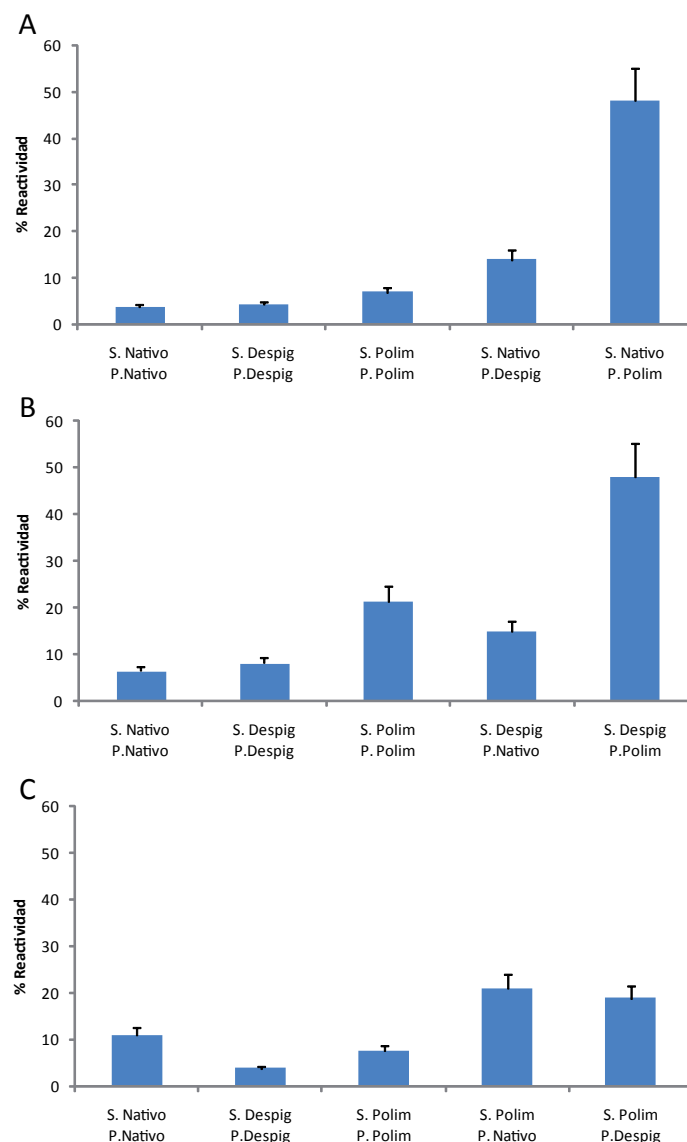


Figura 13. Ensayos de inhibición de reactividad. Reactividad en % de los sueros frente al extracto nativo (A), despigmentado (B) y polimerizado (C) al preincubarlos con distintos extractos. S. Nativo: Suero proveniente de animales inmunizados con extracto nativo. S. Despigmentado: Suero proveniente de animales inmunizados con extracto despigmentado. S. Polimerizado: Suero proveniente de animales inmunizados con extracto polimerizado. P. Nativo: La preincubación se realiza con extracto nativo. P. Despigmentado: La preincubación se realiza con extracto despigmentado. P. Polimerizado: La preincubación se realiza con extracto polimerizado.

4.3. Respuesta celular: producción de citoquinas in vitro por parte de esplenocitos de ratones inmunizados

Al valorar, en los ensayos anteriores, la respuesta humoral suscitada tras la administración de los extractos en presencia y ausencia de los adyuvantes, se observaron diferencias en la inmunogenicidad total, en el tipo de respuesta IgG1/IgG2a y en los niveles de IgE total con respecto al extracto y al adyuvante utilizado. En los siguientes ensayos se pretende aclarar si estas diferencias se pueden asociar con variaciones en los perfiles de las citoquinas que se producen al re-estimular in vitro células de bazo de los animales inmunizados. En el caso de los animales inoculados con extracto despigmentado y polimerizado también se analizó el patrón de citoquinas tras una estimulación cruzada con extracto nativo.

Se inocularon tres dosis por vía subcutánea espaciadas 15 días a 16 grupos de cinco ratones con dosis de 25 µg de proteína total de cada extracto y con los adyuvantes CpG y AIOH según se muestra en la tabla 3. Siete días después de la tercera dosis se sacrificaron los animales y se les extrajo el bazo. Los bazos obtenidos se procesaron de forma conjunta para cada grupo de inmunización, y sus células fueron estimuladas con extracto nativo en todos los casos y con extracto despigmentado o polimerizado según el extracto con el que fueron inmunizados. Los sobrenadantes se recogieron a las 48 horas y fueron concentrados cuatro veces antes de medir los niveles de citoquinas con el sistema FlowCitomix. Los valores determinados para cada citoquina se comparan con sus respectivos grupos control, inoculados sólo con PBS, CpG o AIOH.

Paralelamente a estos ensayos también se midió proliferación tras la estimulación con los distintos extractos mediante la incorporación de timidina tritiada. Los tres extractos indujeron proliferación en esplenocitos provenientes de animales inoculados con los distintos extractos y en animales *naïve*, lo que demuestra que ninguno de los extractos tiene un efecto inhibitor del crecimiento celular (datos no mostrados).

Las nueve citoquinas analizadas se agruparán para su análisis en seis categorías: citoquinas Th1 (IL-2 e IFN-γ), Th2 clásicas (IL-4 e IL-5), reguladoras (IL-10), Th17 (IL-17), proinflamatorias (IL-1α y TNF-α) y Th2 proinflamatorias (IL-6).

4.3.1. Citoquinas de tipo Th1

IL-2

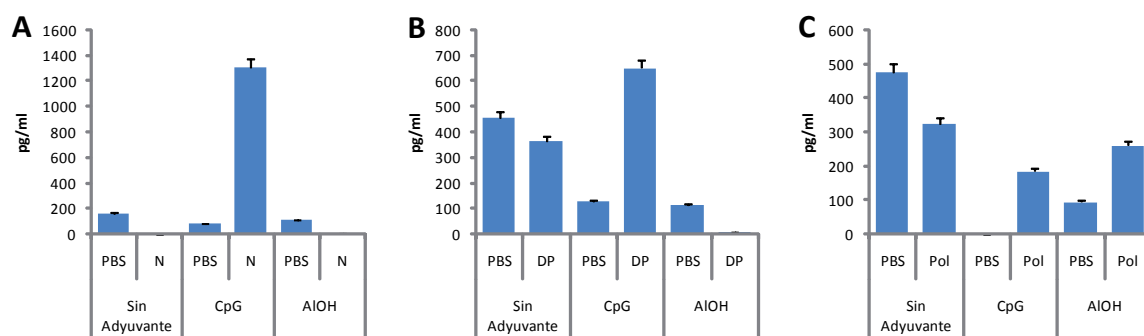


Figura 14. Producción de IL-2 en respuesta a la estimulación in vitro. (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado

Tras la re-estimulación con extracto nativo, sólo en el caso de los animales inoculados con extracto nativo + CpG los niveles de IL-2 aumentan con respecto a los controles (Figura 14A). En los grupos inmunizados sin adyuvante y con AIOH, no se detecta esta citoquina.

Al estimular con extracto despigmentado las células provenientes de los animales inoculados con el mismo extracto (Figura 14B) se observa que solamente en el caso del grupo inmunizado con CpG, la concentración de IL-2 detectada es mayor que para el grupo control. Al inocular el extracto sin adyuvante, los niveles son similares a los del grupo control y cuando se inocula el extracto adsorbido a AIOH, no se detecta IL-2 en el sobrenadante.

La estimulación con extracto polimerizado intensifica la producción de IL-2 con respecto a los grupos control cuando se inocula el extracto polimerizado en combinación con cualquiera de los dos adyuvantes (Figura 14C). En los grupos inmunizados sin adyuvante se observan los niveles más altos, tanto en el control como en el inmunizado con extracto polimerizado.

IFN- γ

En los grupos inoculados con extracto nativo y tras su reestimulación, se detectaron niveles significativos IFN- γ en los animales inoculados con CpG como adyuvante. En los dos grupos restantes (extracto nativo sin adyuvante y extracto nativo + AIOH) los niveles de IFN- γ resultaron menores que los de sus respectivos grupos control (Figura 15A).

Al estimular con extracto despigmentado, se aprecia que los grupos inmunizados con CpG responden con niveles mayores de IFN- γ (Grupo control: 4800 pg/ml; despigmentado + CpG: 11500 pg/ml) (Figura 15B). Los valores en animales inoculados sólo con el extracto despigmentado (3100 pg/ml) son similares a los del grupo control (2300 pg/ml). En el grupo inmunizado con despigmentado adsorbido a AIOH no se detectó IFN- γ .

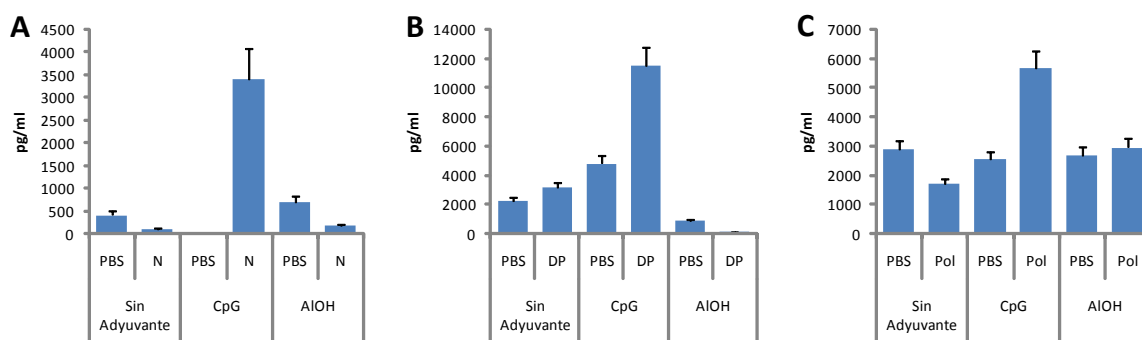


Figura 15. Producción de IFN- γ en respuesta a la estimulación in vitro. (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

En los grupos estimulados con extracto polimerizado se detectan niveles de IFN- γ superiores a los de su grupo control en el grupo inoculado con este extracto en presencia de CpG como adyuvante (11500 pg/ml frente a 4800 pg/ml). Cabe destacar también que la reestimulación con este extracto es la única capaz de inducir la producción de IFN- γ en los grupos inoculados con AIOH (Figura 15C).

4.3.2. Citoquinas de tipo Th2

IL-4

De los animales inmunizados con extracto nativo, sólo el grupo inoculado con el extracto adsorbido a AIOH produjo IL-4 tras la reestimulación (132 pg/ml, Figura 16A). Si se estimula con extracto despigmentado, el grupo inoculado con este extracto sin adyuvante produce también niveles medibles de esta citoquina (71 pg/ml). En el caso de la estimulación con extracto polimerizado, el único grupo en el que se puede medir IL-4 es el de los inoculados con el extracto polimerizado adsorbido a AIOH (145 pg/ml, Figura 16C).

IL-5

La re-estimulación con extracto nativo no produjo niveles detectables de esta citoquina en el grupo inoculado con este extracto en combinación con CpG (Figura 17A).

Sí se detectó la producción de IL-5 (64 pg/ml) en el grupo de animales inoculados sin adyuvante. Al administrar este extracto adsorbido a AIOH se observaron bajos niveles de IL-5, similares a los medidos en el grupo control.

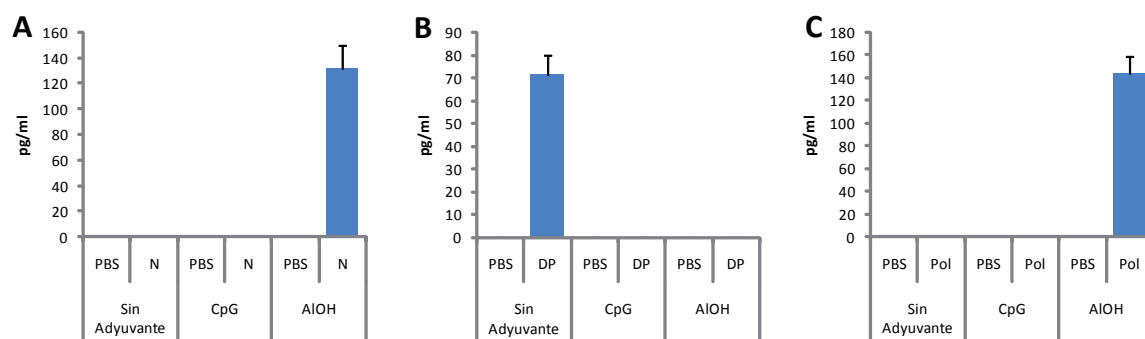


Figura 16. Producción de IL-4 en respuesta a la estimulación in vitro. (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

En los grupos inoculados con extracto despigmentado, la estimulación produce niveles superiores a los controles al inocularlo en ausencia de adyuvantes (205 pg/ml frente a 30 pg/ml). También se detectó esta citoquina en los sobrenadantes de los animales inmunizados con CpG en combinación con el extracto (91 pg/ml, Figura 17B), valores similares a los observados en su grupo control (70 pg/ml).

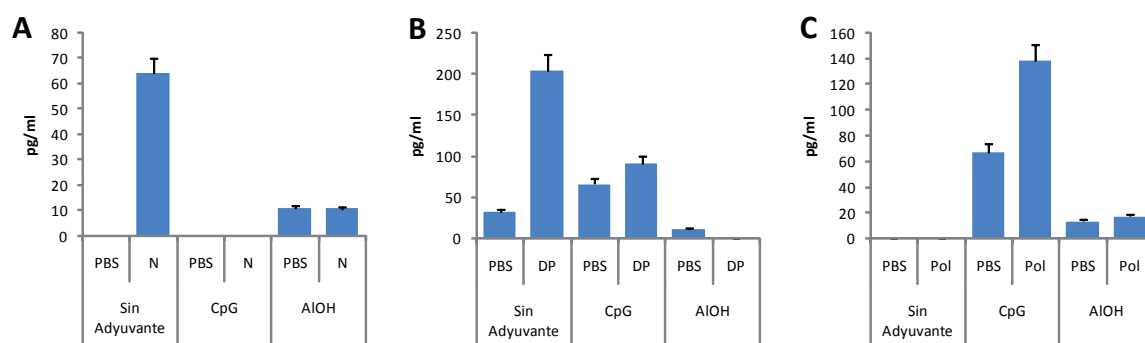


Figura 17. Producción de IL-5 en respuesta a la estimulación in vitro (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

Finalmente, al medir la concentración de IL-5 en los sobrenadantes de las células provenientes de los grupos inoculados con extracto polimerizado y estimulados con el mismo extracto, sólo se detectaron niveles superiores al grupo control en el grupo inmunizado con el polimerizado y CpG (Figura 17C).

4.3.3. Citoquinas reguladoras: IL-10

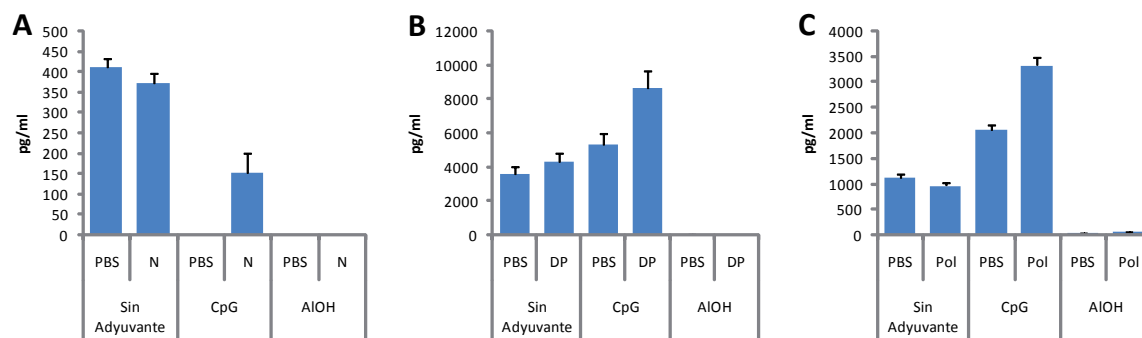


Figura 18. Producción de IL-10 en respuesta a la estimulación in vitro (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

La estimulación con extracto nativo sólo produjo niveles superiores de IL-10 a los de los grupos control al inmunizar con extracto nativo en combinación con CpG (Figura R18A). Al re-estimular con extracto despigmentado y polimerizado, los niveles detectados son claramente superiores. Cabe destacar que el CpG como adyuvante produce los niveles más altos de IL-10, en los grupos inoculados con extracto despigmentado (estimulados con extracto despigmentado) y polimerizado (estimulados con extracto polimerizado). En ninguno de los grupos inmunizados con AIOH se detectaron niveles de esta citoquina, independientemente del estímulo utilizado.

Resultados

4.3.4. Citoquinas Th-17: IL-17

Los niveles más altos para esta citoquina al estimular con extracto nativo fueron detectados en el grupo inmunizado con el extracto en combinación con CpG (Figura 19A). En este caso, la concentración de IL-17 detectada (2870 pg/ml) fue muy superior a la del control inoculado únicamente con CpG (64 pg/ml). En el caso del grupo inoculado sin adyuvante, los valores medidos (337 pg/ml) fueron ligeramente inferiores a los del grupo control (560 pg/ml). Al utilizar AIOH como adyuvante, la concentración de IL-17 en el sobrenadante es muy baja (63 pg/ml), un orden de magnitud por debajo del grupo control.

En respuesta a la reestimulación con extracto despigmentado (Figura 19B), no se detectó IL-17 en el grupo inoculado con el extracto adsorbido a AIOH. En los animales inoculados con extracto despigmentado sin adyuvante, se obtuvieron valores superiores a los del grupo control (10700 pg/ml frente a 8200 pg/ml). Al utilizar CpG como adyuvante, la diferencia con respecto al control se hace mucho más patente, detectándose en este grupo los niveles más altos de IL-17 (46700 pg/ml).

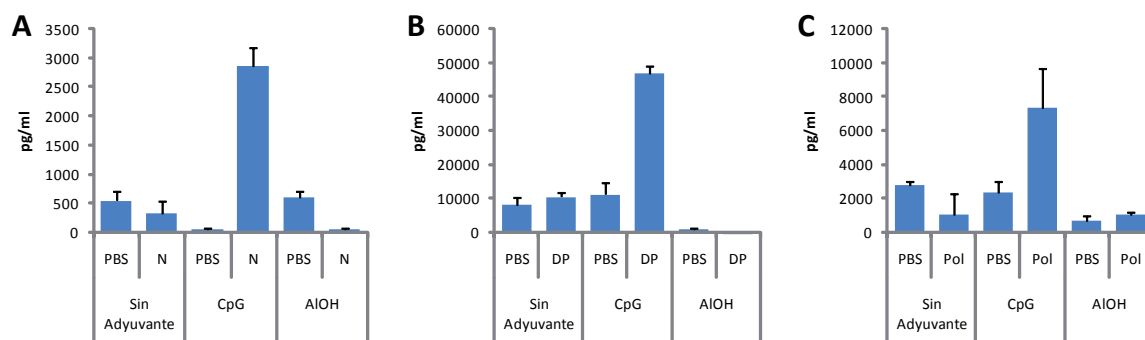


Figura 19. Producción de IL-17 en respuesta a la estimulación in vitro (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

En los grupos inmunizados con el extracto polimerizado y estimulados con el mismo extracto se observa que los niveles más altos corresponden al grupo inmunizado con extracto polimerizado + CpG (Figura 19C). Cabe destacar también que en el grupo inmunizado sin adyuvante, la producción de IL-17 es menor que en el grupo control.

4.3.5. Citoquinas proinflamatorias

IL-1 α

En el grupo inoculado sin adyuvante se midieron niveles de esta citoquina inferiores a los del grupo control en respuesta a la estimulación con extracto nativo (Figura 20A). Cuando se utiliza CpG como adyuvante no se detecta producción de IL-1 α en ninguno de los grupos. Al inocular el extracto adsorbido a AIOH, se detectaron valores similares a los del grupo control.

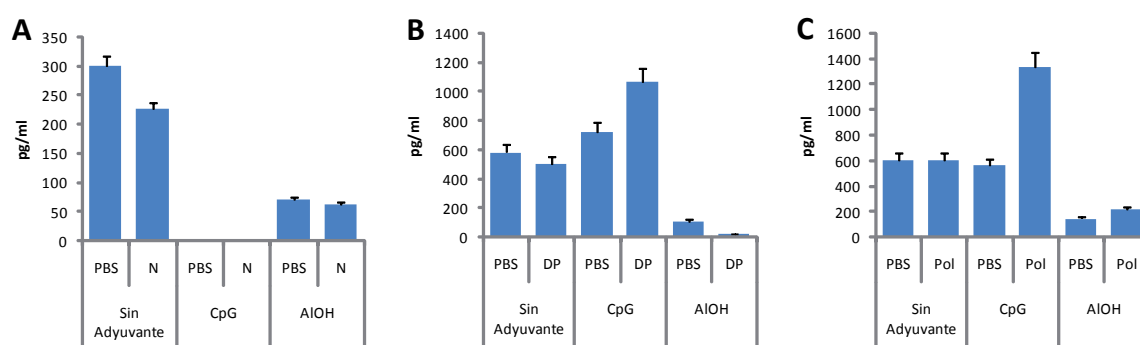


Figura 20. Producción de IL-1 α en respuesta a la estimulación in vitro (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

Al reestimar con extracto despigmentado los niveles de IL-1 α medidos en los grupos inmunizados sin adyuvante y con este extracto adsorbido a AIOH son similares a los de sus respectivos grupos control, sin embargo, sí se detectaron niveles superiores a los del control en el grupo en que se utilizó CpG como adyuvante (Figura 20B).

La reestimulación con extracto polimerizado (Figura 20B) sólo produjo niveles considerablemente mayores que los del grupo control en el caso del grupo inoculado con el extracto en combinación con CpG. En este grupo se observaron los niveles de IL-1 α más altos del ensayo (1340 pg/ml). En los grupos restantes, los niveles de IL-1 α fueron similares (grupo inoculado sin adyuvante) o ligeramente superiores (inoculados con el extracto adsorbido a AIOH) a sus respectivos controles.

TNF- α

La figura 21 muestra los niveles medidos para TNF- α . Sólo se detectó la producción de esta citoquina en los grupos inoculados con extracto polimerizado (Figura 20C) en combinación con CpG o AIOH utilizando como estímulo el mismo extracto con el que fueron inmunizados. En el caso del extracto polimerizado inoculado con CpG, los valores son mayores que los observados en los controles (64 frente a 28 pg/ml) y cuando se utiliza AIOH como adyuvante ocurre lo contrario (42 frente a 19 pg/ml).

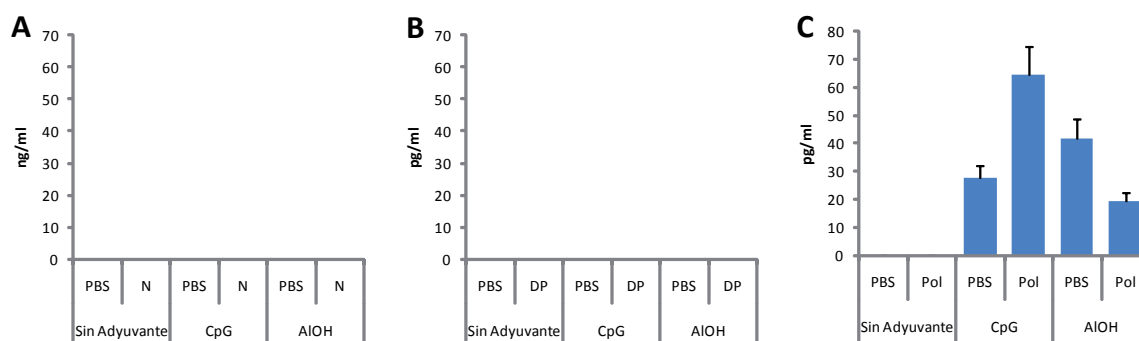


Figura 21. Producción de TNF- α en respuesta a la estimulación in vitro (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

4.3.6. Citoquinas de tipo Th2 proinflamatorias: IL-6

Al estimular con extracto nativo (Figura 22A), los valores más altos se observan en los grupos inmunizados sin adyuvante. Cuando se administra el extracto nativo en combinación con CpG se observó una concentración de 5870 pg/ml frente a 702 pg/ml en el grupo control. En el grupo de animales inmunizados con extracto nativo adsorbido a AIOH, la concentración de IL-6 medida en el sobrenadante resultó ser claramente menor que en el resto de los grupos y similar a los valores obtenidos para el grupo control.

Al contrario de lo observado en el caso anterior, la estimulación con extracto despigmentado (Figura 22B) genera unos niveles mayores de IL-6 en el grupo en que se utilizó este extracto en combinación con CpG. Cuando se administra el extracto despigmentado sin adyuvante los valores de IL-6 detectados son similares a los del grupo control. Los valores detectados en los grupos inmunizados con AIOH son mucho menores al compararlos con los otros grupos (sin adyuvante y CpG).

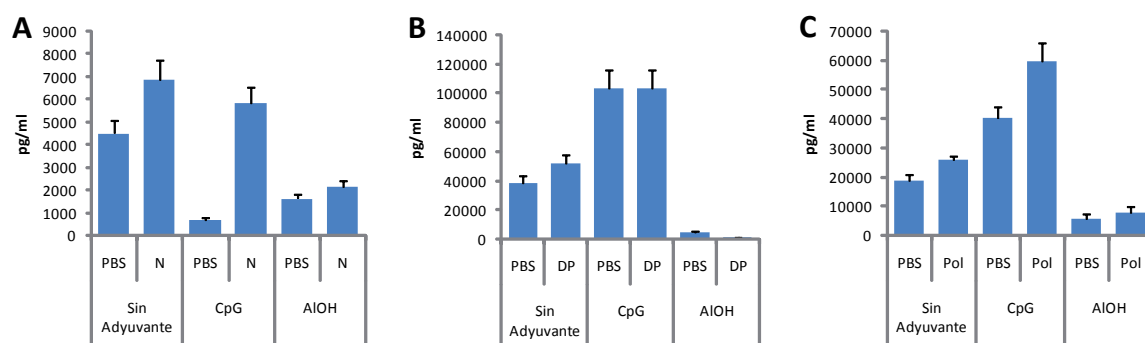


Figura 22. Producción de IL-6 en respuesta a la estimulación in vitro (A) Células estimuladas con extracto nativo. (B) Células estimuladas con extracto despigmentado. (C) Células estimuladas con extracto polimerizado. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

Resultados

Lo mismo sucede en los grupos inmunizados con extracto polimerizado. La estimulación con el mismo extracto administrado produce también un aumento en los niveles de IL-6 con respecto a la estimulación con extracto nativo (Figura 22C). También en este caso se detecta una producción mayor de IL-6 en los grupos inoculados con CpG al compararlos con los grupos inoculados sin adyuvante y con AIOH.

4.3.7. Respuesta frente a la estimulación cruzada con extracto nativo de los grupos inmunizados con extracto despigmentado y polimerizado

En los ensayos anteriores, se ha medido la producción de las distintas citoquinas al estimular las células de bazo de los distintos grupos con el mismo extracto con el que fueron inoculados. La efectividad de estos extractos como vacuna dependería de la respuesta suscitada tras un hipotético encuentro posterior con los alérgenos de *D. pteronyssinus* en estado nativo. A continuación se muestran los resultados obtenidos al estimular con extracto nativo los esplenocitos de los grupos inmunizados con extracto despigmentado y polimerizado y se comparan con lo observado anteriormente para los grupos inmunizados con extracto nativo y re-estimulados con el mismo extracto (Figura 23).

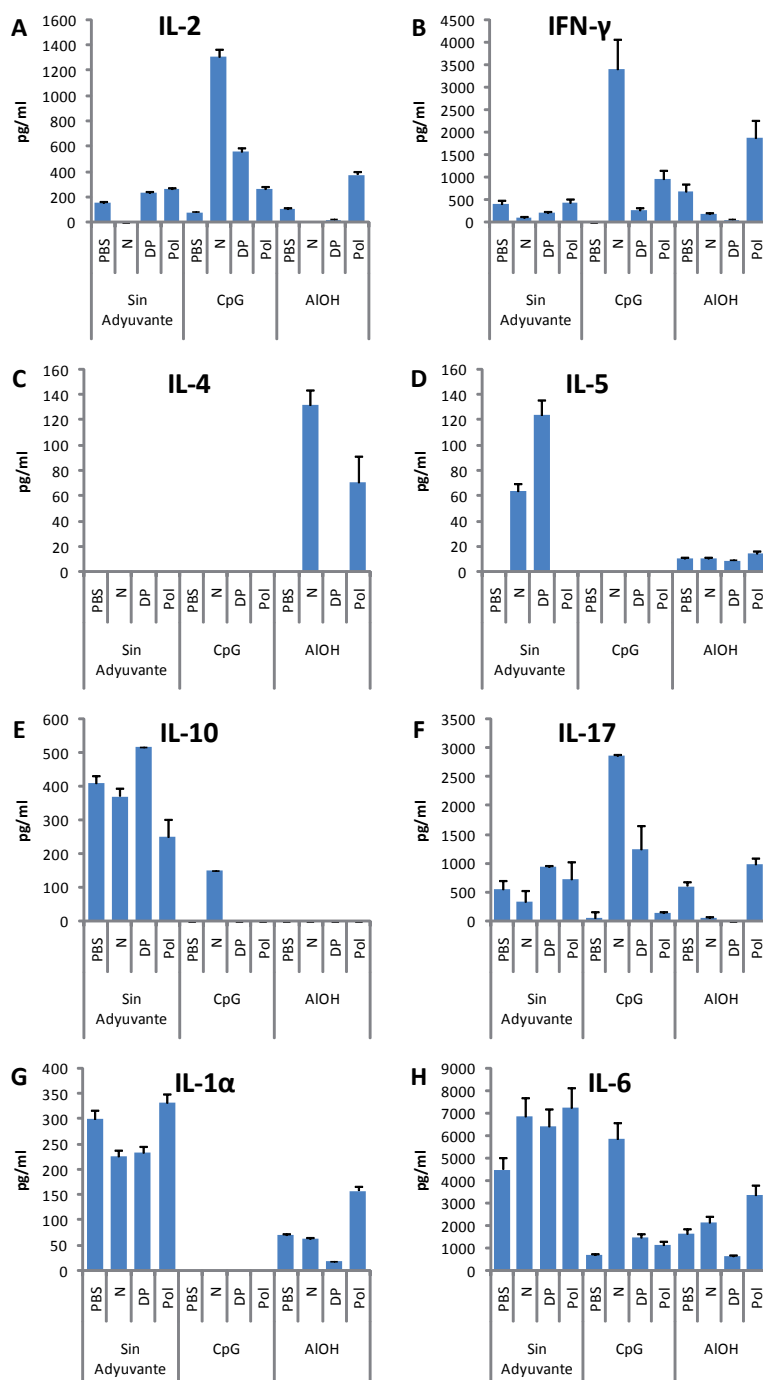


Figura 23. Producción de citoquinas tras la estimulación cruzada. Se muestran los niveles de todas las citoquinas analizadas. N: Grupo inoculado con extracto nativo. DP: grupo inoculado con extracto despigmentado. Pol: Grupo inoculado con extracto polimerizado.

IL-2

Al administrar los extractos sin adyuvante, los niveles de IL-2 medidos en los grupos inmunizados con extracto despigmentado (236 pg/ml) y polimerizado (262 pg/ml) son ligeramente superiores a los observados en el grupo control inoculado con PBS (160 pg/ml) (Figura 23A). Como ya se había comentado anteriormente, en el grupo inoculado con el extracto nativo no se detectó producción de esta citoquina en el sobrenadante.

Los valores más altos de esta citoquina tras la estimulación con extracto nativo se observaron en los grupos que utilizaron CpG como adyuvante. En los tres grupos inmunizados con los extractos y CpG los niveles detectados son superiores al grupo control (83 pg/ml). El grupo inmunizado con extracto nativo + CpG presenta los niveles más altos (1300 pg/ml), seguido del despigmentado +CpG (560 pg/ml) y el polimerizado + CpG presenta el valor más bajo (270 pg/ml).

De los grupos inmunizados con AIOH, cabe destacar los niveles observados al inocular el extracto polimerizado (380 pg/ml) superiores a los medidos en los grupos inoculados con extracto nativo (no detectada), polimerizado (24 pg/ml) y en el grupo control inoculado sólo con AIOH.

IFN- γ

La estimulación con extracto nativo produce niveles superiores a los de los grupos control en los tres grupos inmunizados con CpG y en el grupo de animales en el que el extracto polimerizado está adsorbido a AIOH (Nativo + CpG: 3400 pg/ml; Despigmentado + CpG: 280 pg/ml; Polimerizado + CpG: 970 pg/ml; Polimerizado + AIOH: 1900 pg/ml) (Figura 23B). En el resto de los grupos (todos los inoculados sin adyuvante, los inoculados con extracto nativo + AIOH y los inoculados con despigmentado + AIOH), los valores de IFN- γ medidos fueron similares o incluso menores que los de sus respectivos grupos control.

IL-4

Al estimular con extracto nativo, los valores de IL-4 son muy bajos, sólo se detecta esta citoquina cuando se utiliza AIOH como adyuvante, concretamente en el grupo de inmunizados con extracto nativo y, en menor medida, en el grupo del polimerizado (170 y 70 pg/ml respectivamente) (Figura 23C).

IL-5

La estimulación con extracto nativo no produjo niveles detectables de esta citoquina en ninguno de los grupos inoculados con CpG ni en el grupo del extracto polimerizado inoculado sin adyuvante (Figura 23D). Sí se detectó la producción de IL-5 en los grupos inoculados con el extracto nativo y despigmentado sin adyuvante (64 y 124 pg/ml respectivamente). En los grupos de animales inoculados con los extractos adsorbidos a AIOH, se observaron bajos niveles de IL-5, similares a los medidos en el grupo control.

IL-10

En los ensayos de estimulación cruzada sólo se detectó esta citoquina en los grupos inmunizados sin adyuvante (Figura 23E). Únicamente al inmunizar con extracto despigmentado, los niveles medidos fueron superiores a los del grupo control inmunizado con PBS.

IL-17

Anteriormente se había descrito que el grupo inmunizado con extracto nativo producía IL-17 en concentraciones ligeramente inferiores a las del grupo control (Figura 23F). Al estimular con extracto nativo los grupos inmunizados con extracto despigmentado y polimerizado se aprecia que los niveles de esta citoquina aumentan (inmunizados con despigmentado: 954 pg/ml; inmunizados con polimerizado: 735 pg/ml) llegando a superar al grupo control inmunizado sólo con PBS. La respuesta en los grupos inmunizados con extracto nativo + CpG alcanza los niveles más altos del ensayo, seguida de los inmunizados con extracto despigmentado en combinación con CpG. Finalmente, de los grupos inmunizados con AIOH destacan los valores obtenidos al inocular con extracto polimerizado (995 pg/ml), superiores a los de su grupo control, y al resto de los grupos inmunizados con este extracto en ausencia de adyuvantes o en combinación con CpG.

IL1- α

Los valores de esta citoquina al estimular con extracto nativo el grupo inoculado con extracto despigmentado sin adyuvante fueron similares a los observados en el grupo inoculado con extracto nativo (Figura 23G). La inmunización con extracto polimerizado produce un aumento en la producción de IL-1 α (334 pg/ml), situándose en niveles similares a los de su grupo control. Al inmunizar con CpG como adyuvante, no se detectó esta citoquina. Finalmente, al cuantificar esta citoquina en los grupos inoculados con los extractos adsorbidos a AIOH, se aprecia un descenso en el grupo inoculado con extracto despigmentado (con respecto a los niveles observados para el grupo inoculado con extracto nativo) y un aumento considerable en el grupo inoculado con extracto polimerizado.

TNF- α

No se detectó esta citoquina tras la estimulación cruzada con extracto nativo en ninguno de los grupos estudiados (resultados no mostrados).

IL-6

Los niveles de esta citoquina en los grupos inoculados con extracto despigmentado y polimerizado sin adyuvante fueron similares a los observados para el extracto nativo (Figura 23H). Sin embargo, al utilizar CpG como adyuvante se aprecia

una reducción considerable en los grupos inoculados con los extractos modificados. Finalmente, la concentración de IL-6 medida en el sobrenadantes del grupo inoculado con extracto despigmentado + AIOH (647 pg/ml) fue menor que la del nativo + AIOH (2181 pg/ml), al contrario que en el grupo inoculado con extracto polimerizado + AIOH, en el que se aprecian niveles superiores de esta citoquina (3391pg/ml), por encima de los medidos en su grupo control (1653pg/ml).

4.4. Variaciones en la composición de poblaciones celulares en ganglio drenante tras la inmunización con los distintos extractos y adyuvantes

Tabla 4

| Grupo | Animales | Extracto | Adyuvante |
|-------|----------|---------------|---------------|
| 1 | 1-20 | Nativo | Sin Adyuvante |
| 2 | 21-40 | Despigmentado | |
| 3 | 41-60 | Polimerizado | |
| 4 | 61-80 | PBS | CpG |
| 5 | 81-100 | Nativo | |
| 6 | 101-120 | Despigmentado | |
| 7 | 121-140 | Polimerizado | |
| 8 | 141-160 | PBS | AIOH |
| 9 | 161-180 | Nativo | |
| 10 | 181-200 | Despigmentado | |
| 11 | 201-220 | Polimerizado | |

En los ensayos anteriores se observa que tanto el extracto como el adyuvante utilizado influyen en la inmunogenicidad, el tipo de respuesta IgG2a/IgG1, los niveles de IgE y el perfil de citoquinas generado tras la estimulación *in vitro*. Estos resultados nos llevan a analizar los cambios en la composición de las poblaciones celulares en el ganglio drenante tras la inmunización con los distintos extractos y adyuvantes.

Resultados

Para este análisis se diseñó un ensayo con 220 ratones BALB/c divididos en once grupos (Tabla 4) a los que se administran, por vía subcutánea en la almohadilla plantar, una dosis de 25 µg de proteína total en cada pata en los días 0 y 14. Se sacrificaron dos animales de cada grupo en los días 2, 4, 7, 9, 14, 16, 18, 21, 23 y 25, y se extraen los dos ganglios poplíteos para proceder al análisis de su composición celular por citometría de flujo. Adicionalmente se sacrificaron cuatro animales *naïve*, cuyos ganglios poplíteos fueron utilizados para la determinación de los porcentajes de cada población en el día 0.

4.4.1. Variaciones en la población de linfocitos B

En primer lugar se analizó el efecto de la inoculación de los dos adyuvantes (Figura 24). Tras la administración de la primera dosis de CpG, el porcentaje de células B220⁺ aumenta, hasta llegar a un primer máximo en el día 7 (Figura 24A). El número de Linfocitos B vuelve a aumentar tras la segunda dosis, alcanzando el máximo en el día 23 (9 días después de ésta). En cuanto a la activación de esta población celular en el ganglio (B220⁺/CD69⁺),

alcanza un pico en el día 2 en el que las células pertenecientes a esta población suponen casi un 20%, para descender posteriormente a unos niveles que oscilan entre el 2 y el 8% durante el resto del experimento (Figura 24C).

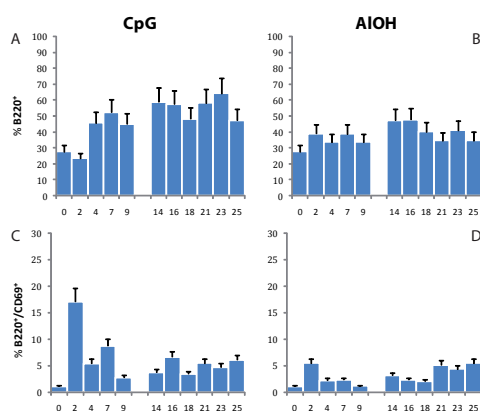


Figura 24. Análisis de la variación de la proporción de células B220⁺ en ganglios de ratones inoculados sólo con CpG (A y C) o sólo con AIOH (B y D).

La administración de AIOH en ausencia de extractos no produjo variaciones significativas en las proporciones de células B220⁺ (Figura 24B). Sin embargo, sí se aprecia un ligero aumento en el porcentaje de células activadas dos días después de la primera dosis. Antes de la administración de la segunda dosis los niveles de activación son similares a los del día 0. Siete días después los niveles de B220⁺ vuelven a subir hasta valores cercanos al 6%.

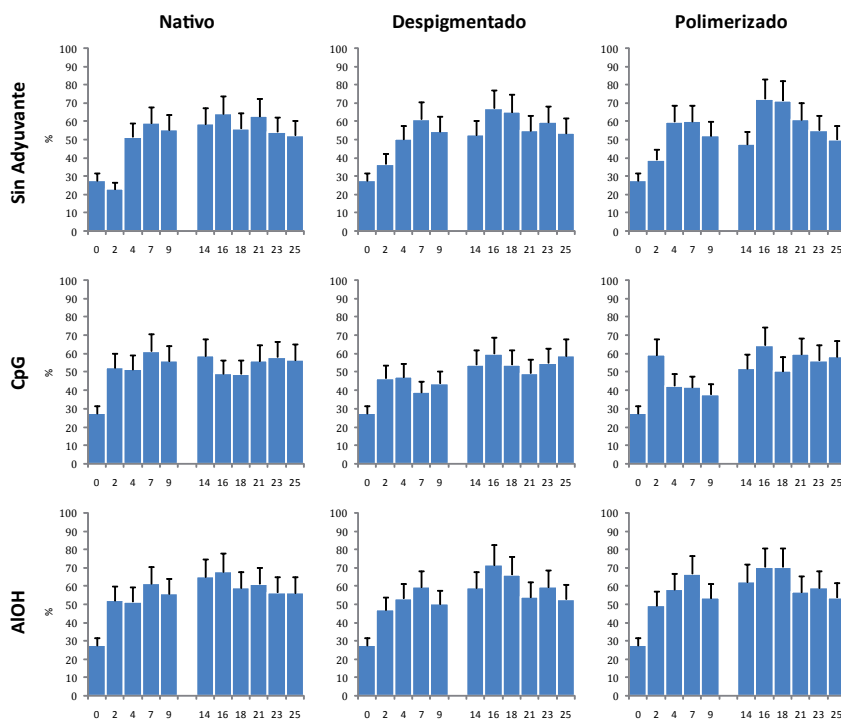


Figura 25. Análisis de la variación de la proporción de células B220⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH.

La figura 25 muestra la evolución de la proporción de células B220⁺ después de la inoculación de la primera y segunda dosis de los distintos extractos en presencia o ausencia de adyuvantes. Todas las formulaciones inducen un aumento significativo en los porcentajes de esta población. El primer pico se observa en el día 7 en todos los casos salvo en los grupos inoculados con extracto despigmentado + CpG y polimerizado + CpG, en el que se adelanta al día 2. Tras la segunda dosis se observa que el aumento de la proporción de linfocitos B no decae, manteniéndose en valores cercanos al 50% (obtenidos en el primer pico tras la primera dosis). El único grupo en que se observa una variación considerable en el porcentaje de esta población tras la segunda dosis es en el de inoculados con extracto polimerizado sin adyuvante, donde se vuelve a alcanzar un máximo en el día 16.

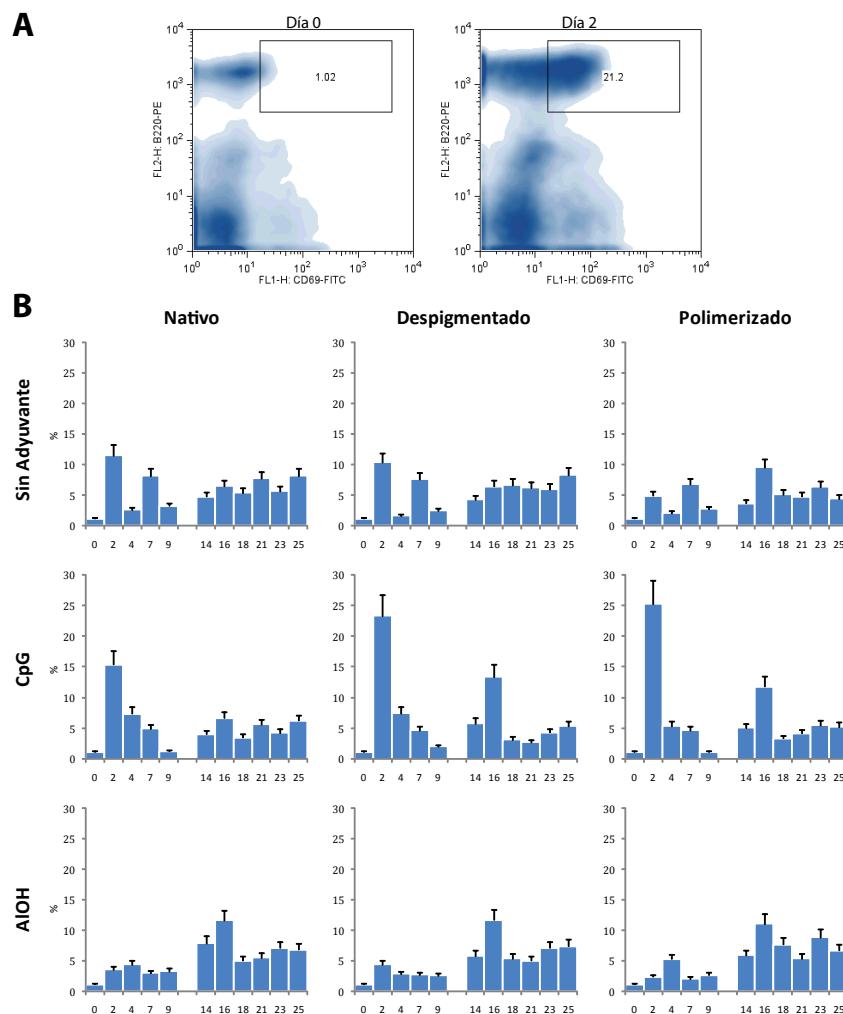


Figura 26. Análisis de la variación de la proporción de células B220⁺/CD69⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH. (A) Histogramas correspondientes a los días 0 y 2 del grupo de animales inoculado con extracto polimerizado y CpG. (B) % de células B220⁺/CD69⁺ en los días post-inoculación

La evolución de la activación de las células B220⁺ se muestra en la figura 26. Al inocular los extractos sin adyuvante, se observan picos de activación en los días 2 y 7 en los tres grupos. En el grupo inoculado con extracto polimerizado se observa también un tercer pico en el día 16, dos días después de la segunda dosis.

Cuando se utiliza CpG como adyuvante, se aprecia un máximo de activación en el día 2, claramente superior al observado al administrar los extractos sin adyuvante. Este aumento es mayor en los grupos inmunizados con extracto despigmentado y polimerizado. En estos dos grupos también se observa un segundo pico de activación tras la segunda dosis, de menor intensidad que el primero, concretamente en el día 16.

No se aprecian incrementos en la proporción de células B220⁺/CD69⁺ en los grupos inoculados con AIOH hasta dos días después de la segunda dosis (día 16). En este caso no se observaron diferencias entre los extractos utilizados para la inmunización.

4.4.2. Variaciones en las poblaciones de linfocitos T

No se observaron variaciones notables en el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ tras la administración de las distintas formulaciones (Figuras 27, 28, 29, 30). Las variaciones observadas se deben a que se están midiendo los porcentajes con respecto a todas las poblaciones celulares del ganglio drenante y un incremento considerable en la población mayoritaria (en este caso, de linfocitos B) necesariamente se ve reflejado en el resto.

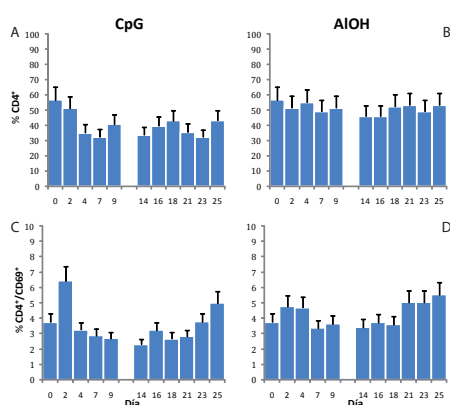


Figura 27. Análisis de la variación de la proporción de células CD4⁺ en ganglios de ratones inoculados sólo con CpG (A y C) o sólo con AIOH (B y D).

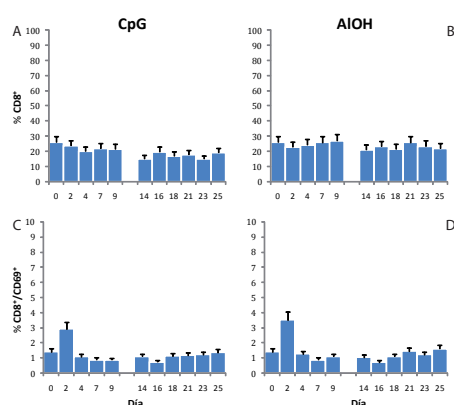


Figura 28. Análisis de la variación de la proporción de células CD8⁺ en ganglios de ratones inoculados sólo con CpG (A y C) o sólo con AIOH (B y D).

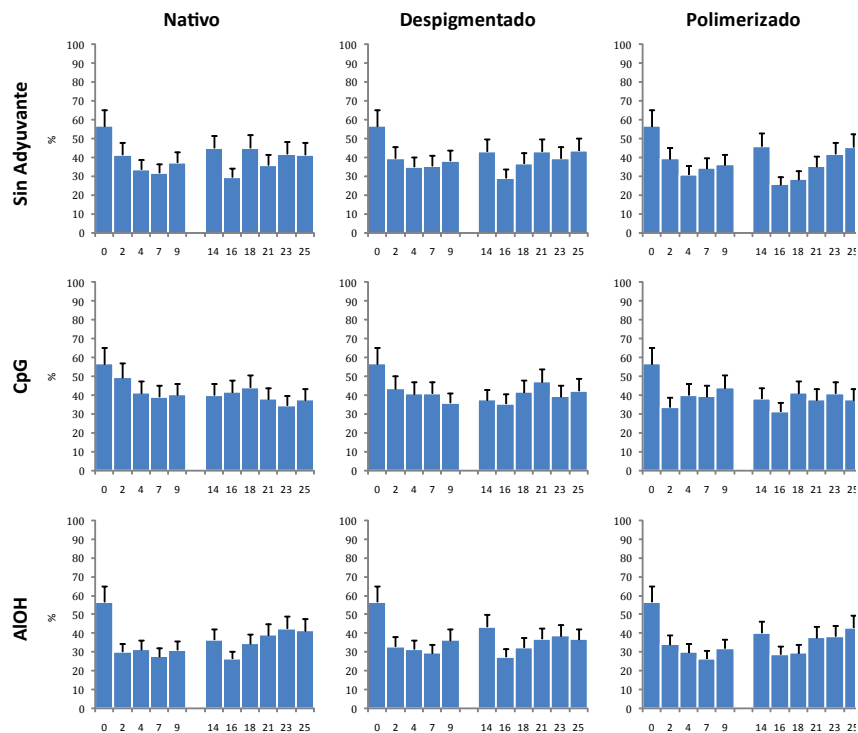


Figura 29. Análisis de la variación de la proporción de células CD4⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH.

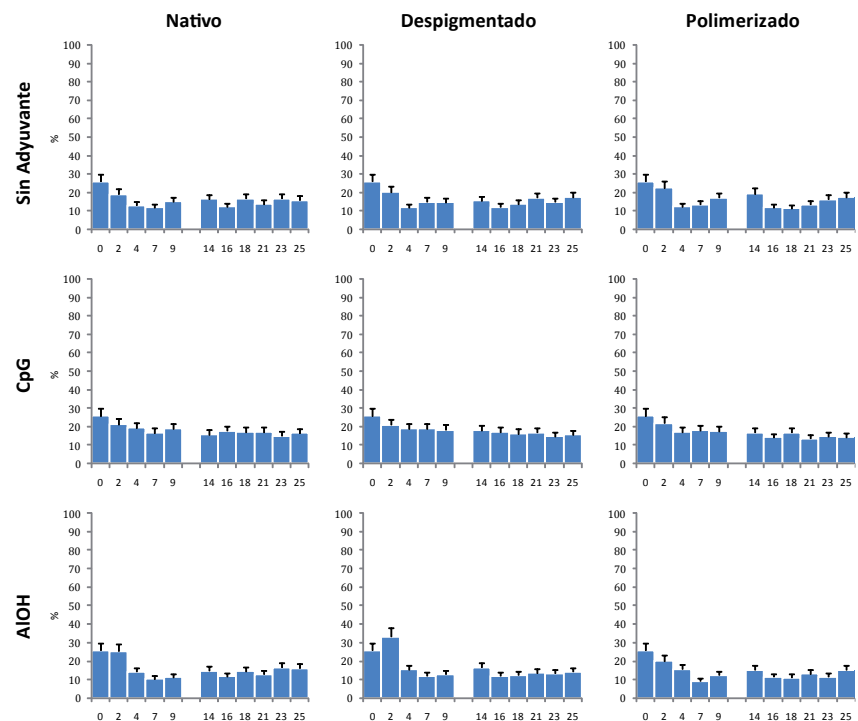


Figura 30. Análisis de la variación de la proporción de células CD8⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH.

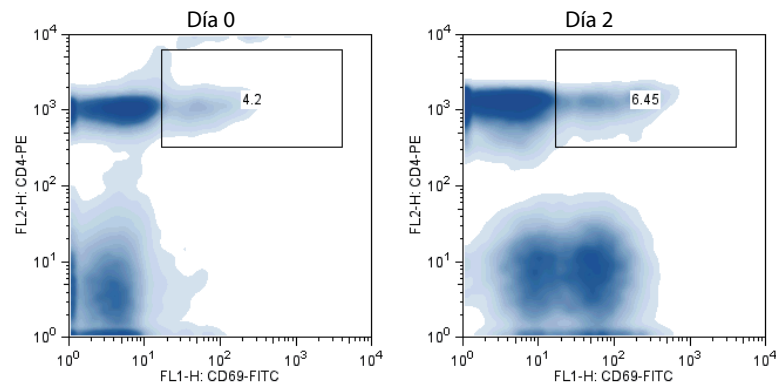
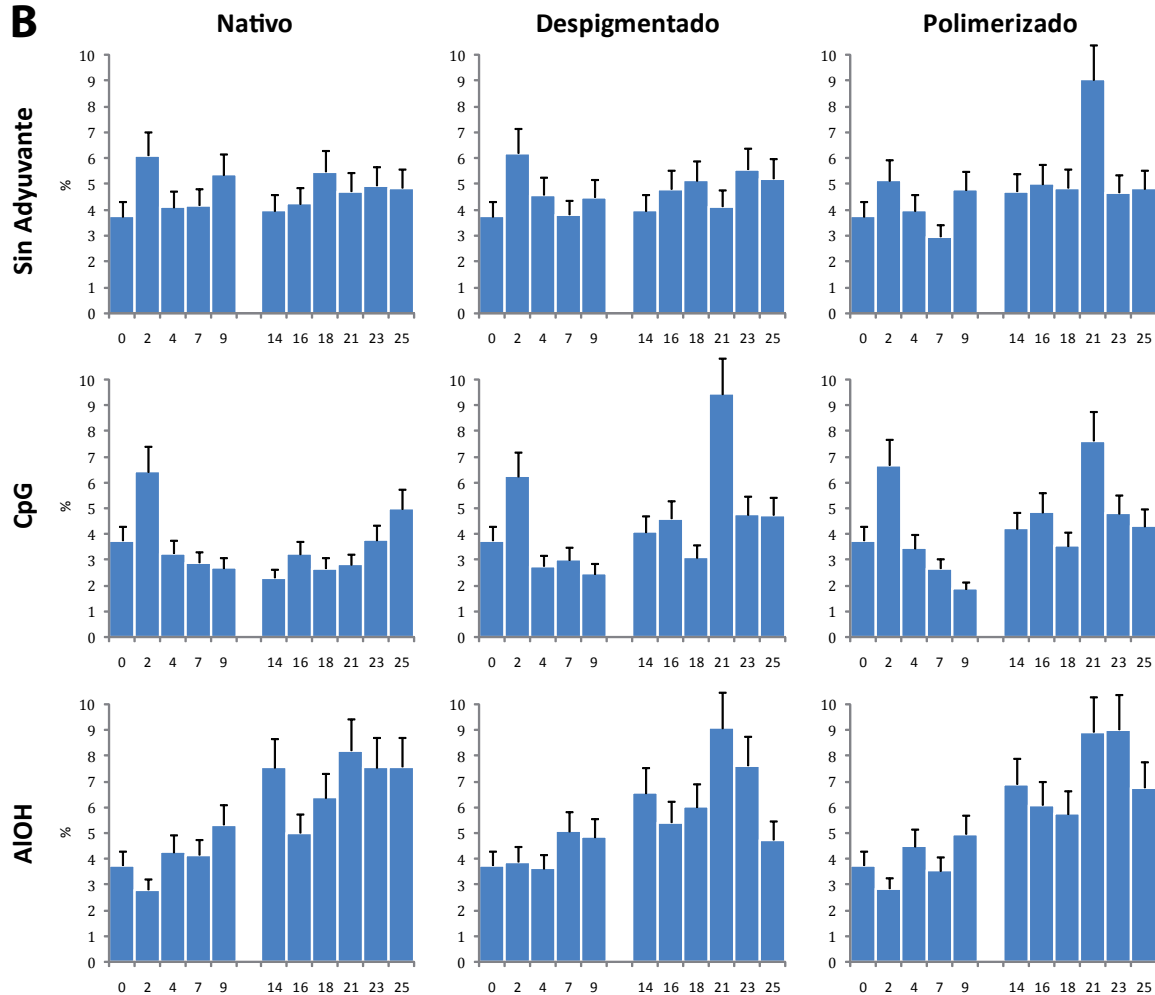
A**B**

Figura 31. Análisis de la variación de la proporción de células CD4⁺/CD69⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH. (A) Histogramas correspondientes a los días 0 y 2 del grupo de animales inoculado con extracto polimerizado y CpG. (B) % de células CD4⁺/CD69⁺ en los días post-inoculación

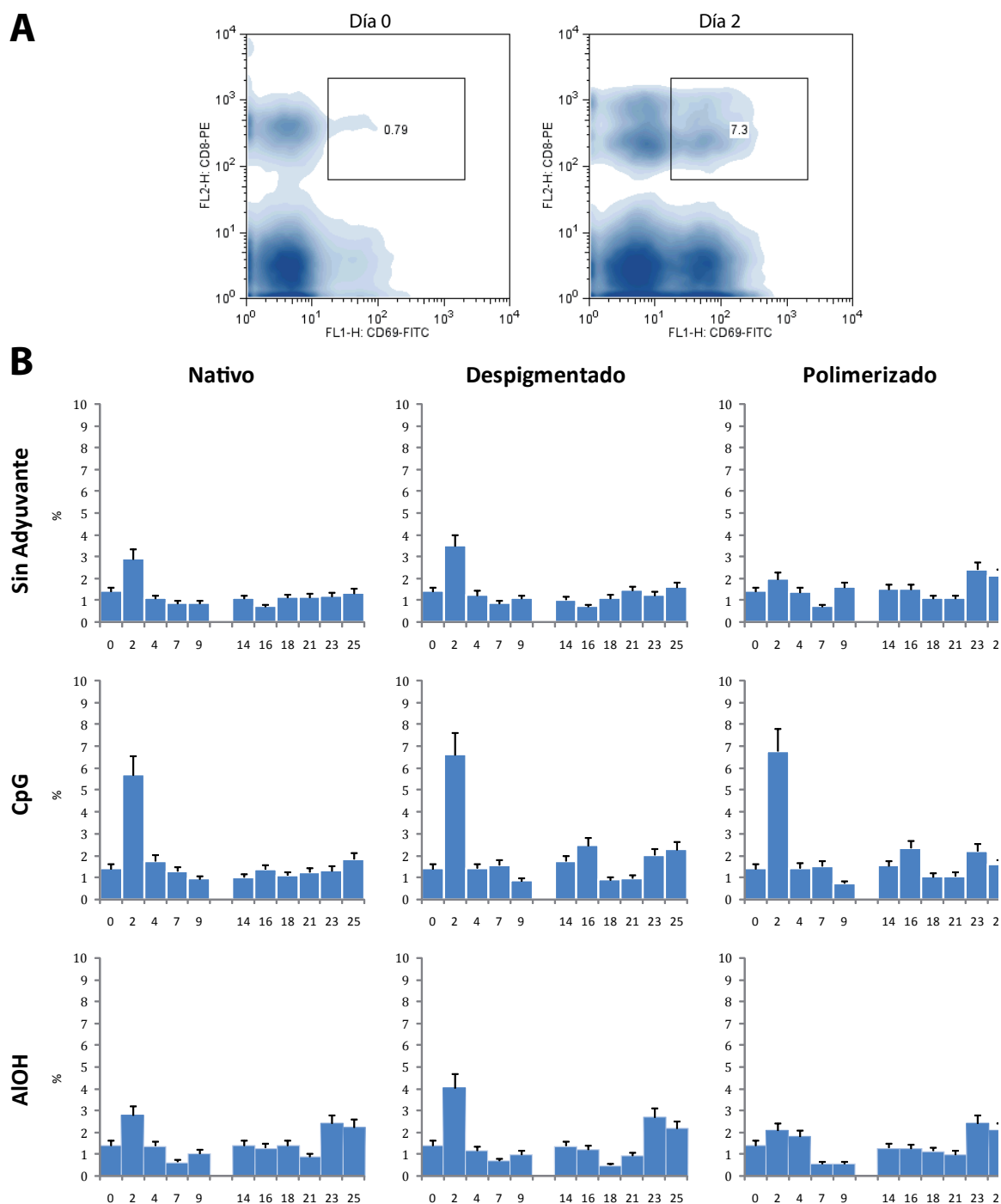


Figura 32. Análisis de la variación de la proporción de células CD8⁺/CD69⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH. (A) Histogramas correspondientes a los días 0 y 2 del grupo de animales inoculado con extracto polimerizado y CpG. (B) % de células CD8⁺/CD69⁺ en los días post-inoculación.

La activación de los linfocitos CD4⁺ en respuesta a la inoculación con los distintos extractos se muestra en la figura 31. En todos los casos inmunizados sin adyuvante y con CpG se observa un pico dos días después de la primera dosis. En los animales inoculados con extracto polimerizado sin adyuvante, despigmentado con CpG y polimerizado con CpG se observa además un segundo pico de activación, de mayor intensidad que el primero, en el día 21 (siete días después de la segunda dosis). En los tres grupos en los que el extracto se administró adsorbido a AIOH, el aumento en la proporción de células CD4⁺/CD69⁺ es progresivo, alcanzando los valores máximos en el día 21, una semana después de la segunda dosis.

En la figura 32 se muestran los perfiles de activación de los linfocitos CD8⁺. En el día 2, se aprecia un máximo de activación en todos los grupos salvo en aquellos en los que el extracto polimerizado se administró sin adyuvante y adsorbido a AIOH. Este pico es claramente superior al utilizar CpG como adyuvante.

4.4.3. Reclutamiento de células dendríticas (CD11c⁺)

La tinción para esta población celular se realizó en combinación con el marcador de células presentadoras CD40. Sólo se observó un aumento en la población de estas células presentadoras al utilizar CpG como adyuvante. Cuando se administra sin extractos, el adyuvante CpG induce máximos cuatro días después de la primera dosis y siete días después de la segunda (Figura 33). Tras la inoculación de los extractos en combinación con este adyuvante (Figura 34) sólo se aprecia un único pico en los niveles de esta población cuatro días después de la primera dosis.

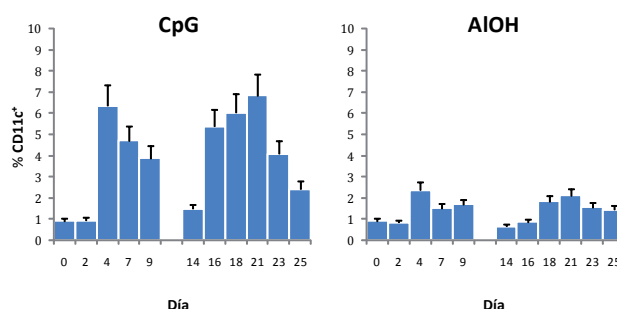


Figura 33. Análisis de la variación de la proporción de células CD11c⁺ en ganglios de ratones inoculados sólo con CpG o sólo con AIOH

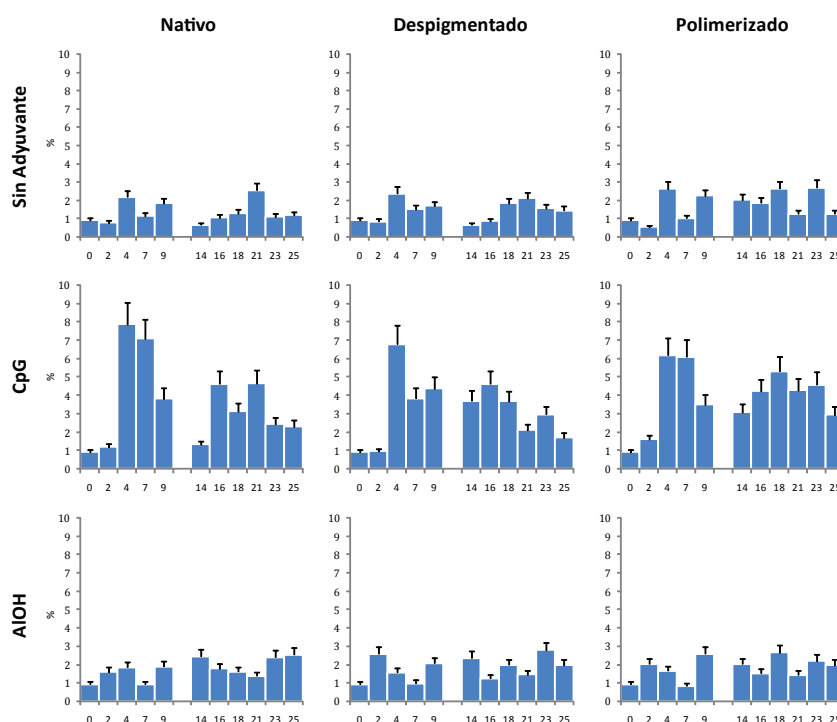


Figura 34. Análisis de la variación de la proporción de células CD11c⁺ en ganglios de ratones inoculados con los tres extractos sin adyuvante, en combinación con CpG y adsorbidos a AIOH.

4.5. Caracterización inmunobiológica del compuesto “C”

En el paso previo a la polimerización, el extracto nativo se somete a un proceso de despigmentación. Durante este proceso se descartan los pigmentos y otros compuestos menores de 5 kDa que teóricamente no poseen propiedades inmunológicamente relevantes. A la fracción descartada se le denomina compuesto “C”. En este apartado se evaluará en primer lugar la capacidad de suscitar una respuesta humoral del compuesto “C”. En segundo lugar se analizará su capacidad de modificar a nivel local la composición de las poblaciones celulares de ganglio. Finalmente se comprobará si la presencia de compuesto “C” influye sobre la viabilidad en cultivo de esplenocitos de ratón.

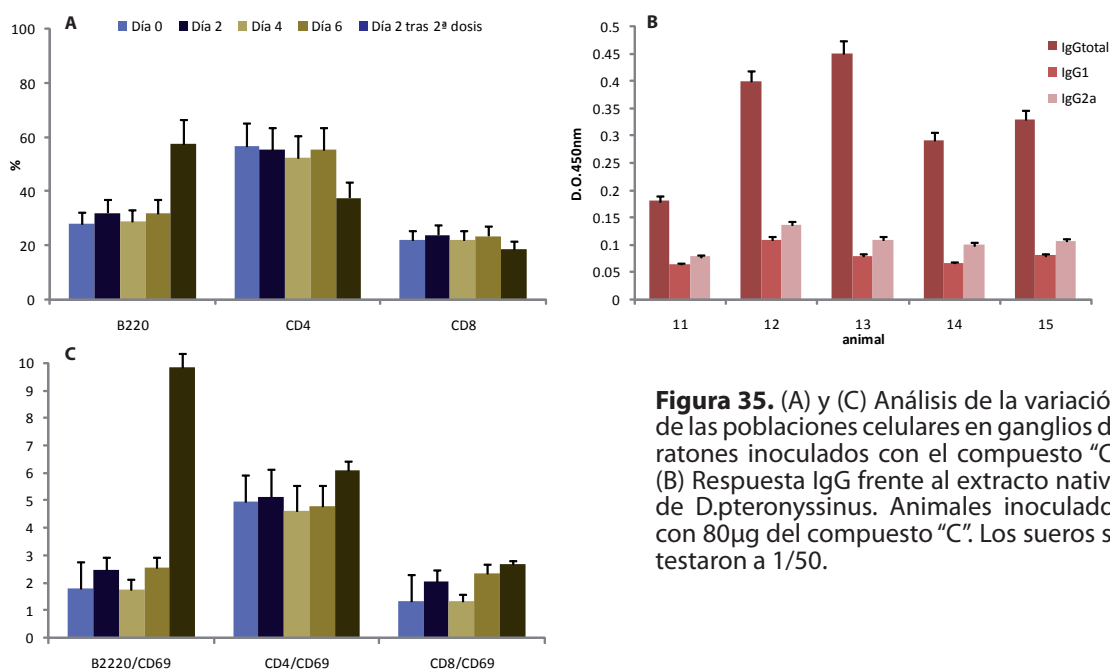


Figura 35. (A) y (C) Análisis de la variación de las poblaciones celulares en ganglios de ratones inoculados con el compuesto “C”. (B) Respuesta IgG frente al extracto nativo de *D.pteronyssinus*. Animales inoculados con 80µg del compuesto “C”. Los sueros se testaron a 1/50.

4.5.1. Respuesta humoral de animales inoculados con compuesto “C”

Para este ensayo se inocularon tres grupos de cinco animales con dosis crecientes de 20, 40 y 80 µg de compuesto “C” por animal. Se administraron tres dosis por vía subcutánea en la almohadilla plantar en los días 0, 15 y 30. Siete días después de la tercera dosis se procedió al sangrado de los animales. En los sueros obtenidos se midió la reactividad IgG total, IgG1 e IgG2a.

No se detectó respuesta en los sueros provenientes de los animales inmunizados con las dosis de 20 y 40 µg (datos no mostrados). En la figura 35B se muestran los valores obtenidos en los sueros diluidos 1/50 de los cinco animales inoculados con 80 µg de compuesto "C". La respuesta es baja y de carácter mixto.

4.5.2. Variación de las poblaciones celulares en ganglio

Para analizar qué sucede a nivel local tras la inoculación del compuesto "C" se administró una primera dosis de 80 µg en cada almohadilla plantar en el día 0. En los días 2, 4 y 6 tras la administración de esta dosis se procede al sacrificio de tres animales a los que se les extraen los ganglios drenantes. El día 9 de experimento se administró una segunda dosis (en idénticas condiciones que la primera) a tres animales que se sacrificaron en el día 11 (dos días tras la administración de la segunda dosis). Las células del ganglio obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo utilizando los marcadores B220, CD4, CD8, CD69, CD40 y CD11c.

No se observó un incremento en el porcentaje de células B220⁺ hasta la administración de una segunda dosis (Figura 35A). Por otro lado el porcentaje de la población de células CD4⁺ y CD8⁺ se mantiene constante tras la administración de la primera dosis y sufre una leve disminución tras la administración de la segunda, consecuencia del incremento en la población de B220⁺ (Figura 35A).

La figura 35C muestra las proporciones de células B220⁺, CD4⁺ y CD8⁺ positivas para el marcador de activación temprana CD69. Tras la administración de las dos primeras dosis no se observó un incremento en el porcentaje de células activadas para ninguna de las poblaciones señaladas. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos B activados (B220/CD69) pasa de un 2% inicial a un 10% tras la administración de la segunda dosis. Las proporciones de células CD4 y CD8 activadas no sufren cambios tras la administración del compuesto "C".

En cuanto a la población de células dendríticas, no se observó ninguna variación tras la inoculación del "compuesto C". Sin embargo, sí se encontraron diferencias en la composición de la población de células CD40⁺ con respecto a lo observado tras la inoculación de los extractos nativo, despigmentado y polimerizado (Figura 36). En el día 2 tras la inoculación de cualquiera de los extractos, la población de células CD40⁺ se duplica y sigue aumentando hasta el día 6. En el día 4 se observa que esta población no es homogénea, se divide en dos subpoblaciones: Una con altos niveles de expresión de CD40 (CD40^{hi}) y otra con niveles bajos de este marcador (CD40^{lo}). En el día 6 la población vuelve a ser homogénea (CD40^{hi}). Dos días tras la inoculación del compuesto "C", se aprecia una división en CD40^{hi} y CD40^{lo} en la población de células CD40⁺ que vuelve a

ser homogénea en el día 4. Cabe destacar que estos cambios tienen lugar a pesar de que la proporción total de esta población celular no varió durante el ensayo. Parece ser que la inoculación del compuesto "C" tiene algún efecto en la expresión de la proteína de superficie CD40 en las poblaciones celulares del ganglio poplíteo drenante.

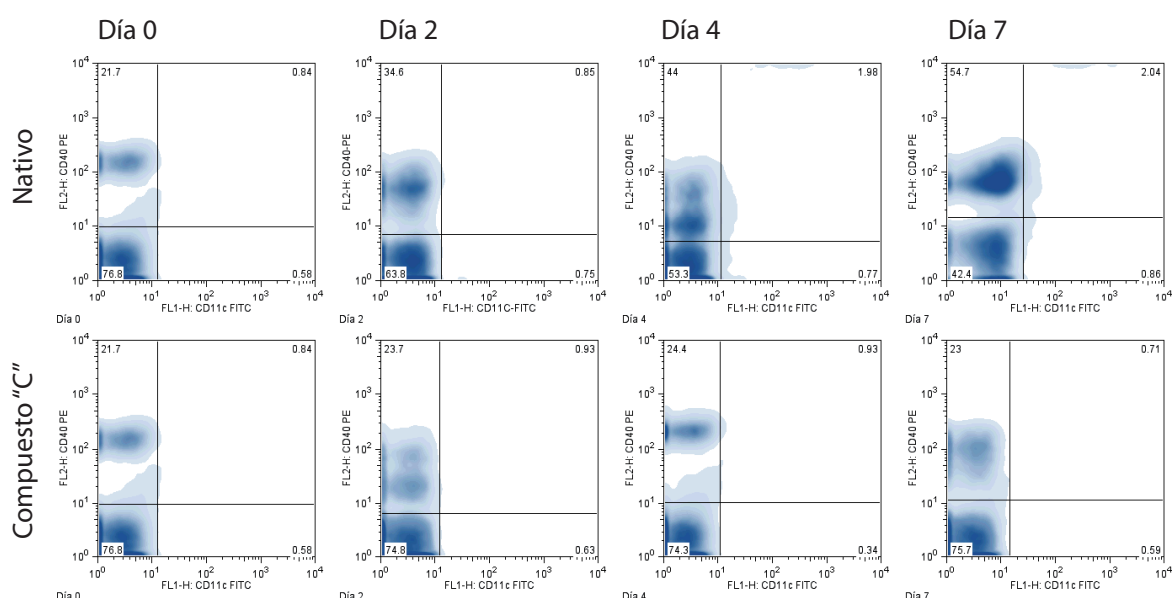


Figura 36. Análisis de la variación de la proporción de células CD40⁺/CD11c⁺ en ganglios de ratones inoculados con extracto nativo y despigmentado sin adyuvante.

4.5.3. Viabilidad de esplenocitos de ratón cultivados en presencia de compuesto "C"

Con el fin de ver si el compuesto "C" resulta tóxico para las células, se analizó la viabilidad tras 24 y 48 horas en cultivo de células de bazo de ratones *naïve*. Se estudió el porcentaje de células muertas en los tiempos indicados al cultivarlas en ausencia de estímulo, estimuladas con un mitógeno (concanavalina A a 3 µg/ml), y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto "C" (20, 40 y 80 µg/ml). La cuantificación de células muertas se determinó por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio.

Tras 24 horas en cultivo en ausencia de estímulo se observó que el porcentaje de células muertas pasa de un 10.31% (día 0) al 41.11%. Si estas células son estimuladas con conA el porcentaje de células muertas alcanza un 61.28%; este aumento se asocia con el incremento en la proliferación (aumento notable de células en cultivo) inducido por este mitógeno. La presencia del compuesto "C" no incrementa de forma notable el porcentaje de células muertas que es del 45.15% en presencia de 20 µg/ml, del 46.30% en presencia de 40 µg/ml, y del 50.34% en presencia de 80 µg/ml (Figura 37).

Tras 48 horas en cultivo en ausencia de estímulo, el porcentaje de células muertas pasa de un 10.31% inicial (día 0) al 54.7%. Si estas células son estimuladas con conA la proporción de células muertas alcanza un 82.9%. La presencia del compuesto "C", como sucedía tras 24 horas en cultivo, no se traduce en una variación significativa del porcentaje de células muertas que es del 61.7% en presencia de 20 µg/ml, del 64.9% en presencia de 40 µg/ml, y del 68.1% en presencia de 80 µg/ml.

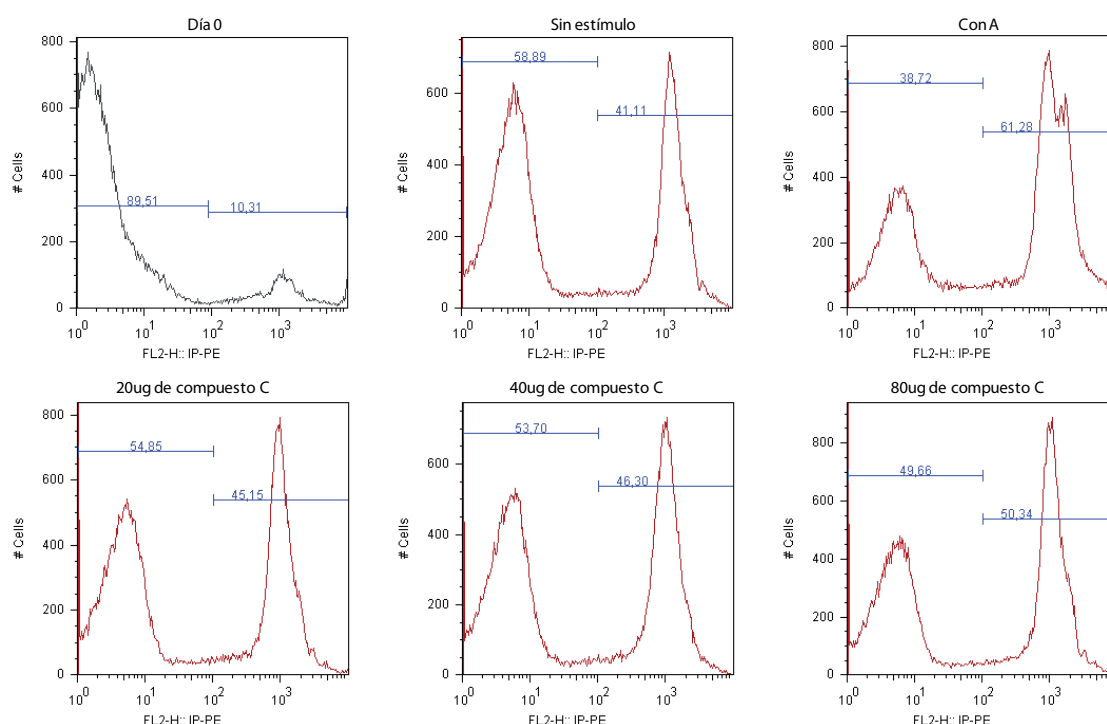


Figura 37. Análisis de la viabilidad de esplenocitos en cultivo en presencia de distintas concentraciones del compuesto "C".

Se realizaron tinciones dobles CD19/IP y CD3/IP con la intención de comprobar si existían diferencias entre los porcentajes de células muertas en las poblaciones de CD19⁺ (células B) CD3⁺ (células T). En el día cero se observó un 5% de células muertas para ambas poblaciones celulares. Tras mantener las células en cultivo en ausencia de estímulo el porcentaje de células B o T muertas se sitúa en torno al 20%. Las células tratadas con ConA presentan mayor porcentaje de células muertas para la población T (CD3⁺/IP⁺ ≈ 40%) mientras que el porcentaje de células B positivas para IP se mantiene en el 20%. Cuando las células se mantienen en cultivo en presencia de las diferentes concentraciones de compuesto "C" la proporción de células B ó T positivas para IP se sitúa en torno al 20% como sucede cuando las células se cultivan en ausencia de estímulo. (Datos no mostrados).

Discusión

5. Discusión

En esta tesis se han analizado las diferencias en la respuesta inmune frente al extracto nativo, despigmentado y polimerizado de *D. pteronyssinus*, así como el papel inmunomodulador e inmunoestimulador que dos adyuvantes de naturaleza distinta tienen sobre la misma, con el fin de proponer alternativas a la inmunoterapia específica tradicional.

El uso de extractos alergénicos modificados como vacunas hipoalergénicas fue propuesto por el grupo de Marsh en 1970. Desde entonces su seguridad y eficacia han sido demostradas en numerosos ensayos clínicos, en los que se aprecia una reducción en la carga sintomática y en la necesidad de medicación en pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma (Ameal *et al.*, 2005; Casanovas *et al.*, 2005a; Fernández-Caldas *et al.*, 2006; García-Robaina *et al.*, 2006; Ibero y Castillo, 2006; Casanovas *et al.*, 2007; Wurtzen *et al.*, 2007).

El hidróxido de aluminio es actualmente el único adyuvante cuyo uso está permitido en humanos. Es un potenciador de la respuesta humoral y genera respuestas de carácter Th2 (Guy, 2007). Como alternativa se propone el uso de oligonucleótidos con motivos CpG, que actúan sobre los mecanismos de respuesta innata, celular y humoral favoreciendo el desarrollo de respuestas de tipo Th1 (Heeg *et al.*, 2008).

El modelo utilizado, los ratones BALB/c, es considerado uno de los más adecuados para llevar a cabo un análisis detallado de la respuesta inmune. Es de destacar, además, que esta cepa de ratones es frecuentemente utilizada en estudios de modulación de la respuesta alérgica (KleinJan *et al.*, 2006; Kim y Yeo, 2007) e inmunoterapia específica, (Vrtala *et al.*, 1998; Brimnes *et al.*, 2007; Hisbergues *et al.*, 2007).

5.1. Propiedades inmunoquímicas de los extractos modificados de *D. pteronyssinus*

La preparación del extracto polimerizado a partir del extracto nativo implica dos pasos. En primer lugar, el extracto nativo se somete a un tratamiento ácido suave controlado seguido de una diálisis que descarta componentes menores de 5 kDa. El resultado de este proceso es el extracto despigmentado, que conserva el contenido proteico mayoritario del extracto nativo pero presenta una cantidad disminuida de pigmentos y otros compuestos alérgicamente no relevantes (Berrens, 1994). Durante el proceso de despigmentación la actividad enzimática del extracto también se ve alterada, reduciéndose entre un 50-100% (Fernández-Caldas *et al.*, 2008). Dado que el extracto despigmentado conserva el mismo contenido proteico, su capacidad de unión a IgG no se ve alterada y la capacidad de unión a IgE se ve ligeramente reducida (Fernández-Caldas *et al.*, 2008) y por lo tanto sus propiedades antigénicas son teóricamente similares a las del extracto nativo.

La fracción descartada durante el proceso de despigmentación se conoce como el compuesto "C". En los experimentos realizados para caracterizar este compuesto, se observó que es poco inmunogénico, necesitando dosis muy elevadas para suscitar una respuesta de baja intensidad. Fue necesaria una segunda dosis para observar reclutamiento y activación de células B en ganglio drenante. Esta dosis no fue suficiente como para alterar las poblaciones de linfocitos T ni de células dendríticas. También se comprobó que la presencia del compuesto "C" no afecta la viabilidad de esplenocitos de ratones *naive* en cultivo. Los datos observados confirman que las sustancias descartadas durante el proceso de despigmentación no tienen propiedades inmunológicamente relevantes.

Discusión

El segundo paso para la obtención del extracto polimerizado consiste en la polimerización propiamente dicha del extracto despigmentado (Casanovas *et al.*, 2005b). Durante este proceso se trata el extracto despigmentado con glutaraldehído, que reacciona con los grupos amino primarios de los residuos de la cadena peptídica de las proteínas presentes en el extracto, alterando la conformación tridimensional de éstas y posiblemente modificando los epítopos conformacionales de los alérgenos contenidos en el extracto. También tienen lugar una serie de entrecruzamientos inter e intramoleculares que resultan en un polímero de alto peso molecular (Marsh *et al.*, 1970; Wurtzen *et al.*, 2007). El resultado es un extracto cuya capacidad de unión a IgE está claramente disminuida, pero que mantiene una capacidad de unión a IgG similar a la del extracto nativo (Casanovas *et al.*, 2005b).

5.2. Caracterización de la respuesta humoral

La relación entre la eficacia de la inmunoterapia específica y la intensidad de la respuesta IgG no está claramente definida. En algunos estudios, se correlaciona un incremento en la reactividad IgG con mejoras clínicas, pero en otros ocurre lo contrario (revisado en Larche *et al.*, 2006). De cualquier modo, los niveles de reactividad IgG siempre son el primer indicador a analizar en un ensayo de inmunización.

Los ensayos de dosis mostraron que la reactividad frente a IgG generada tras la inmunización depende de la dosis administrada. Sin embargo a partir de los 25 µg de proteína total inoculados no se observó una mayor intensidad de la respuesta, lo cual sugiere que a partir de esta dosis se alcanza el umbral de estimulación del sistema inmune. Es importante señalar que se aplicó la misma dosis de proteína total en todos los grupos, independientemente del extracto utilizado.

El extracto despigmentado demostró ser el más inmunogénico, independientemente del adyuvante utilizado. En principio no se esperaba observar diferencias con respecto al extracto nativo, dado que el contenido proteico de ambos es muy similar. Sin embargo, la ausencia de pigmentos y otras sustancias inmunológicamente irrelevantes convierte al extracto despigmentado en un extracto de mayor riqueza, en cuanto al contenido proteico se refiere, lo que puede repercutir directamente en su capacidad inmunogénica.

La inoculación de los extractos en combinación con CpG indujo los efectos esperados, que se reflejan en un aumento de la respuesta IgG en todos los casos. Destaca la capacidad de este adyuvante de triplicar la respuesta cuando se administra con el extracto polimerizado. En este grupo se observaron los niveles de reactividad IgG más altos de todo el estudio.

El AIOH también potenció la respuesta IgG al administrarse en combinación con el extracto nativo. Sin embargo, no parece tener un efecto cuantitativo sobre la inmunogenicidad de los extractos despigmentado y polimerizado.

La importancia de la reactividad IgG tras la inmunización no reside sólo en su intensidad, sino que también es fundamental la actividad funcional de los anticuerpos generados. Así, la posible producción de anticuerpos de tipo IgG bloqueantes que compiten por el mismo epítipo que anticuerpos IgE es fundamental para aumentar la efectividad de una vacuna (Visco *et al.*, 1996; Denepoux *et al.*, 2000). En los ensayos de inhibición se pretendía averiguar si los distintos procesos a los que se somete el extracto nativo modifican su antigenicidad y si existen diferencias entre los repertorios

de anticuerpos generados tras la inmunización con los distintos extractos. Para ello se midieron las variaciones en la reactividad de los sueros de animales inmunizados tras preincubarlos en presencia de un exceso de los distintos extractos. El extracto polimerizado sólo fue capaz de inhibir en un 50% la reactividad de los sueros provenientes de la inmunización con extracto nativo y despigmentado. Este hecho confirma que el proceso de polimerización puede ocultar los epítomos IgG presentes en el extracto nativo o despigmentado e incluso modificar estructuralmente las proteínas presentes en el extracto, produciendo cambios notables en su antigenicidad.

Ni el extracto nativo ni el despigmentado consiguieron inhibir totalmente la reactividad del suero proveniente de animales inmunizados con extracto polimerizado. Estos sueros conservaron un 20% de su reactividad al preincubarlos con los extractos mencionados, lo que sugiere que existen anticuerpos generados en respuesta al extracto polimerizado específicos para este extracto e implica la generación de nuevos epítomos durante el proceso de polimerización.

En el extracto despigmentado se observa un comportamiento similar, aunque en menor medida, al observado para el extracto polimerizado. El extracto despigmentado sólo fue capaz de inhibir la reactividad de los sueros provenientes de los animales inmunizados con extracto nativo en un 85%. A su vez, el suero de animales inoculados con el extracto despigmentado conservó un 15% de su reactividad tras preincubarlo con extracto nativo. Estos datos sugieren que el proceso químico de despigmentación no sólo altera la estructura de las proteínas presentes en el extracto sino que modifica en algún grado las propiedades inmunogénicas y antigénicas del extracto confirmando lo sugerido por Fernández-Caldas (2008). Del mismo modo, los datos sugieren que el repertorio de anticuerpos generados por el extracto nativo no es idéntico al generado por el extracto despigmentado.

Ante la imposibilidad de medir la respuesta IgE específica, se comparó la concentración en suero de IgE total tras la inoculación de los extractos en presencia o ausencia de adyuvantes con los niveles observados en los grupos control. Los altos niveles observados al administrar el extracto nativo adsorbido a AIOH coinciden con los esperados, dado que esta combinación es la utilizada normalmente para experimentos de sensibilización de ratones BALB/c frente a un alérgeno (Herz *et al.*, 2004).

Sin embargo, la utilización de AIOH como adyuvante al inocular los extractos despigmentado y polimerizado no provocó un aumento en los niveles de este subtipo. Como ya se ha dicho anteriormente, el proceso de polimerización reduce considerablemente la capacidad de unión a IgE del extracto polimerizado convirtiéndolo en

un extracto hipoalergénico (Ameal *et al.*, 2005; Casanovas *et al.*, 2005a; Casanovas *et al.*, 2005b; Fernández-Caldas *et al.*, 2006; Ibero y Castillo, 2006; Casanovas *et al.*, 2007), incluso cuando se administra en combinación con un adyuvante que favorece respuestas de tipo Th2.

Los niveles de IgE observados al inocular el extracto despigmentado en combinación con AIOH pueden parecer contradictorios con respecto a lo descrito en la literatura, ya que no se ha mostrado que este extracto sea hipoalergénico cuando se utiliza en pruebas cutáneas (Casanovas *et al.*, 2005b). Sin embargo, sí se ha descrito como un extracto cuya capacidad de unión a IgE está ligeramente alterada y su actividad enzimática está reducida (Fernández-Caldas *et al.*, 2008). La reducción de la actividad enzimática puede ser clave en la inducción de los niveles de IgE observados, dado que el alérgeno mayor Der p 1 está descrito como una cisteín-proteasa (Chua *et al.*, 1988) cuya actividad enzimática facilita los procesos de sensibilización y los procesos inflamatorios que tienen lugar al entrar en contacto con ácaros del polvo doméstico (Hewitt *et al.*, 1995).

Los niveles más bajos de IgE se observaron al inocular el extracto polimerizado tanto sin adyuvante como en presencia de CpG. A pesar de no haber diferencias significativas entre ellos, la inoculación del extracto polimerizado con CpG como adyuvante fue la única en la que los niveles de IgE medidos fueron inferiores a los del grupo control inoculado sólo con CpG. Estos resultados confirman el papel de este adyuvante como modulador de la respuesta Th2 característica que tiene lugar durante una reacción alérgica.

5.3. Estudio de la respuesta local en ganglio drenante

El primer encuentro con el antígeno es el que determina el destino fenotípico de los linfocitos T CD4⁺. La diferenciación hacia Th1, Th2, T reguladoras o Th17 tiene lugar tras este primer contacto y queda comprometida (Schmidt-Weber *et al.*, 2007). Así, nos pareció importante estudiar los cambios en la composición de las poblaciones celulares que tienen lugar durante los primeros días tras la inoculación de los extractos en presencia y ausencia de los adyuvantes CpG y AIOH.

El estudio de la respuesta local en ganglio drenante se utiliza frecuentemente para evaluar los efectos a corto plazo que la inoculación de adyuvantes tiene sobre las poblaciones celulares (Lovik *et al.*, 2007). Los motivos CpG son un potente inmunoestimulador que actúa de manera inmediata activando los mecanismos de respuesta innata mediante el receptor TLR9, presente principalmente en células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y linfocitos B, y en menor medida en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Marsland y Kopf, 2007). Su uso como adyuvante en combinación con los tres extractos incrementó los niveles de activación de Linfocitos B, T CD4⁺ y CD8⁺ tras la primera dosis, favoreciendo a su vez un reclutamiento masivo de células dendríticas CD11c⁺. Es interesante observar que la presencia de estas pDCs activadas está relacionada con la generación de interacciones tolerogénicas durante la presentación antigénica y con la diferenciación de células T reguladoras capaces de suprimir reacciones alérgicas en el modelo BALB/c (de Heer *et al.*, 2004).

La inoculación del extracto despigmentado mostró diferencias con respecto al extracto nativo cuando se administró en combinación con el adyuvante CpG. Se apreciaron picos de activación tras la segunda dosis en células B220⁺ (día 16) y en linfocitos CD4⁺ (día 21). Dado que este pico de activación no se observa en animales inoculados sólo con CpG sugerimos que la activación es antígeno-específica. Los segundos picos de activación observados pueden ser consecuencia de la mayor riqueza proteica de este extracto unida a la capacidad del adyuvante CpG de reducir el umbral de activación de linfocitos T específica de antígeno (Marsland y Kopf, 2007).

El extracto polimerizado induce en ausencia de adyuvantes un segundo pico de activación de linfocitos B y T CD4⁺ (en los días 16 y 21 respectivamente) que no se observa al inocular en las mismas condiciones los extractos nativo y despigmentado. Esto sugiere que dadas las características del extracto, sobre todo su elevado tamaño (>100 kDa), que dificultan su procesamiento y presentación se requiere una activación antígeno-específica de células B y T CD4⁺ tras la segunda dosis.

El comportamiento observado en el grupo inoculado con extracto polimerizado y CpG fue muy similar al observado con el extracto despigmentado y el mismo adyuvante. La segunda dosis también indujo un segundo pico de activación antígeno-específico en células B220⁺ y linfocitos T CD4⁺, coincidiendo este último con el porcentaje mayor observado en la población de células dendríticas CD11c⁺ que tiene lugar siete días después de la segunda dosis (día 21). La unión de estos dos sucesos (activación de CD4⁺ y aumento de pDCs) se podría asociar con una presentación de antígeno con carácter tolerogénico (Akbari *et al.*, 2001; de Heer *et al.*, 2004) inducida por la combinación de las características inmunoquímicas del extracto polimerizado con las propiedades inmunomoduladoras e inmunoestimuladoras intrínsecas del adyuvante CpG.

5.4. Modulación del perfil de citoquinas

Como ya se ha comentado, el éxito de una terapia de inmunización está relacionado con una reversión del perfil Th2 característico de una respuesta alérgica hacia un fenotipo Th1-T_{reg} (Akdis y Blaser, 2000; Valenta, 2002; Akdis *et al.*, 2004; Verhoef *et al.*, 2005; Larche *et al.*, 2006). Para establecer el tipo de respuesta Th1/Th2 se midieron los niveles de las citoquinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) y Th2 (IL-4 e IL-5) clásicas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos reestimulados con el extracto con el que fueron inmunizados. Adicionalmente se realizó una estimulación cruzada con extracto nativo en el caso de los grupos inmunizados con extracto despigmentado y polimerizado con la intención de observar el efecto que pudiera tener un hipotético reencuentro con el alérgeno en estado natural. Otro indicador de la polarización de la respuesta es la relación IgG1/IgG2a específica de antígeno, dado que la producción de IFN- γ favorece la secreción de IgG2a mientras que niveles altos de IL-4 favorecen la secreción de IgG1 (Stevens *et al.*, 1988).

La inoculación de los tres extractos en ausencia de adyuvante se tradujo en todos los casos en una respuesta Th2, puesta de manifiesto por las bajas relaciones IgG2a/IgG1 obtenidas en los sueros de animales inmunizados. Estos datos se confirmaron al analizar el perfil de citoquinas observado tras la estimulación *in vitro* de esplenocitos provenientes de animales inmunizados, en los que se aprecian bajos niveles de IFN- γ e IL-2 en todos los grupos y una subida en los niveles de IL-4 (grupo inoculado con extracto despigmentado) e IL-5 (grupos inoculados con extracto nativo y despigmentado).

La adsorción de los extractos a AIOH exacerbó aún más la respuesta Th2 observada en ausencia de adyuvantes. Los valores obtenidos al calcular la relación IgG2a/IgG1 son incluso menores y van acompañados de niveles menores de IL-2 e IFN- γ (en animales inoculados con extracto nativo o despigmentado) y de aumentos en la producción de IL-4 (en animales inoculados con extracto nativo o polimerizado). Cabe destacar que en el grupo inmunizado con extracto polimerizado, la reestimulación no indujo una disminución en los niveles de IFN- γ y provocó un aumento en la producción de IL-2.

El uso de ODNs con motivos CpG como adyuvante tuvo los efectos de polarización esperados de acuerdo con lo descrito anteriormente en la literatura (Jain *et al.*, 2003; Heeg *et al.*, 2008). En todos los casos se observó un aumento de la respuesta IgG2a que derivó en un aumento significativo en las relaciones IgG2a/IgG1.

Tras la administración de extracto nativo en presencia de CpG, la reestimulación *in vitro* se tradujo en subidas moderadas en los niveles de IFN- γ que no fueron capaces de revertir la respuesta IgG1 predominante observada en ausencia de adyuvante, derivando en una respuesta de carácter mixto (IgG2a/IgG1=1.24).

Un efecto similar se observa en los animales inoculados con extracto despigmentado en combinación con CpG. En este caso, la producción de IFN- γ es mucho mayor y está acompañada de un descenso en los niveles de IL-4 y de una ligera subida en la cantidad de IL-5 producida tras la estimulación. Sin embargo, no se observó una reversión total de la respuesta IgG1, e incluso la relación IgG2a/IgG1 fue menor que la observada para el extracto nativo en las mismas condiciones (IgG2a/IgG1=0.75).

Sólo cuando la formulación administrada es el extracto polimerizado junto al CpG se logra una reversión total de la respuesta IgG2a/IgG1 (IgG2a/IgG1=1.80) a pesar de que el perfil de citoquinas Th1/Th2 generado tras la reestimulación fue muy similar al observado en el grupo inoculado con extracto despigmentado y el mismo adyuvante.

Los perfiles de citoquinas Th1/Th2 observados tras la estimulación cruzada con extracto nativo de los esplenocitos provenientes de animales inmunizados con los extractos despigmentado y polimerizado fueron similares a los observados tras la reestimulación con el mismo extracto con los que fueron inoculados. La menor intensidad observada parece ser una consecuencia del hecho de que el estímulo no es el mismo con el que se inmunizó inicialmente. Esto indica que el perfil de citoquinas está determinado por el extracto inoculado independientemente del extracto empleado para la estimulación *in vitro*. Esta conclusión se confirma por el hecho de que los perfiles de citoquinas en los controles sí se ven condicionados por el estímulo empleado.

La respuesta IgG2a/IgG1 en suero no se ajusta estrictamente al balance clásico de citoquinas Th1/Th2, lo cual sugiere que existen otras citoquinas involucradas en la regulación de este proceso.

Los linfocitos T_{reg} se consideran el eje que regula la polarización Th1/Th2. Su principal característica es la expresión del factor de crecimiento FoxP3 y ejercen su función reguladora principalmente a través de IL-10, que es capaz de inducir anergia en células previamente polarizadas hacia Th1 ó Th2.

La población de células T reguladoras juega un papel fundamental en la supresión de las respuestas de tipo Th2 exacerbadas que tienen lugar durante las reacciones alérgicas (Valenta, 2002). En individuos alérgicos, están disminuidas y su recuperación está asociada al éxito de la aplicación de inmunoterapia específica (Akdis *et al.*, 2004; Larche, 2007).

La producción de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con los extractos en ausencia de adyuvante no superó en ningún caso lo observado en el grupo control, y sus niveles en el caso de los animales inoculados con los extractos adsorbidos a AIOH fueron indetectables.

Al utilizar CpG como adyuvante se observan incrementos en la producción de IL-10 en todos los casos, aunque con diferencias importantes en cuanto a su intensidad. La inoculación del extracto nativo produjo niveles muy bajos de esta citoquina. Al inocular los extractos despigmentado y polimerizado, los valores observados fueron 40 y 20 veces superiores respectivamente. Cabe destacar que la estimulación *in vitro* con el extracto despigmentado produjo niveles muy altos de esta citoquina incluso en el grupo control (inoculado sólo con CpG). El incremento observado en los animales inmunizados con este extracto + CpG es proporcionalmente similar al que se observa al comparar el grupo inoculado con extracto polimerizado con su grupo control.

El perfil de producción de IL-1 α coincide con los aumentos en la producción de IL-10 observados en los grupos inoculados con extracto despigmentado + CpG y polimerizado + CpG. Además de ser considerada una citoquina proinflamatoria, también se ha descrito como un factor de crecimiento para células T_{reg} (Brinster y Shevach, 2008), favoreciendo la expresión de FoxP3.

La IL-10 no es una citoquina exclusiva de los linfocitos T_{reg}, sino que también puede ser producida por linfocitos Th17, un cuarto tipo de células T CD4⁺ patogénicas recientemente descrito (Infante-Duarte *et al.*, 2000). Los linfocitos Th17 pueden jugar un papel fundamental en el agravamiento de los procesos de inflamación aguda que tienen lugar en los casos crónicos de asma severa y dermatitis atópica a través de la acción combinada de IL-17 e IL-22 (Schmidt-Weber *et al.*, 2007; Oboki *et al.*, 2008). Sin embargo, si se diferencian en el bazo, en presencia de IL-6 y TGF- β , las células Th17 pierden sus propiedades patogénicas y se convierten en secretoras de IL-17 e IL-10 (McGeachy *et al.*, 2007).

Discusión

En los sobrenadantes de cultivo provenientes de los tres grupos inmunizados con CpG como adyuvante se detectaron altos niveles de IL-6 e IL-17, con diferencias similares en intensidad a las observadas para la producción de IL-10. El análisis combinado de los niveles de IL-1 α , IL-6 e IL-17, nos lleva a deducir que la producción de IL-10 observada tras la inoculación del extracto despigmentado + CpG y el extracto polimerizado + CpG puede ser producto de dos tipos distintos de linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T reguladores y las células Th17. Sin embargo, no se observó producción de IL-1 α en los sobrenadantes de cultivo de los animales inoculados con extracto nativo + CpG. Por lo tanto se podría asumir que los bajos niveles de IL-10 observados en este grupo son producto principalmente de células Th17 de actividad patogénica restringida.

5.5. Hipótesis del mecanismo de respuesta de las distintas formulaciones

El tipo de respuesta Th1/Th2 inducida frente a los extractos en ausencia de adyuvantes depende de sus propiedades antigénicas e inmunogénicas. Siguiendo la propuesta de Adkis (1998) y dado que la respuesta frente al extracto nativo se caracteriza por la producción de citoquinas de tipo Th2 pensamos que la presentación de los epítopos IgG e IgE del extracto alergénico está mayoritariamente mediada por anticuerpos. El mismo perfil de respuesta se observa al inocular el extracto despigmentado que posee una capacidad inmunogénica mayor. Las diferencias estructurales del extracto polimerizado con respecto al extracto nativo y despigmentado es posible que dificulten la presentación mediada por anticuerpos y se favorezca, por otro lado, su presentación por vía fagocítica. La presentación por vía fagocítica de alérgenos con modificaciones estructurales ha sido asociada con la producción de IL-12 y la generación de perfiles de citoquinas de tipo Th1 (Akdis *et al.*, 1998). A pesar de ser un extracto cuya estructura está modificada, el extracto polimerizado no es capaz, en ausencia de adyuvantes, de generar una respuesta de carácter Th1/Th2 distinta a las anteriores.

El uso de AIOH como adyuvante favorece el desarrollo de una respuesta Th2 claramente definida. En el caso del extracto nativo, la presencia de epítopos IgE permite su reconocimiento y presentación mediada por este anticuerpo, resultando en una sensibilización que aumenta drásticamente la producción de IgE. El tratamiento ácido al que se somete el extracto despigmentado reduce su actividad enzimática y puede alterar estructuralmente los epítopos IgE (Fernández-Caldas *et al.*, 2008). En este caso se evitaría una sensibilización como la observada al inocular el extracto nativo. El extracto polimerizado, cuya capacidad de unión a IgE está claramente reducida (Casanovas *et al.*, 2005b; Casanovas *et al.*, 2007), puede ser presentado preferentemente por vía fagocítica. En el grupo de animales inmunizados con el extracto polimerizado en presencia de AIOH se observaron niveles altos de IFN- γ tras la estimulación tanto con el extracto con el que fueron inmunizados como tras la estimulación cruzada con el extracto nativo. Esta producción mayor fue, sin embargo, insuficiente para contrarrestar la polarización inducida por el AIOH.

Los motivos CpG favorecen una respuesta de tipo Treg-Th1 (Hussain *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2006). Desde este punto pensamos que la respuesta de tipo Th1 observada después de la administración de CpG junto a los tres extractos es de tipo Treg. Esta respuesta es menos patente al inocular el extracto nativo y acarrea subidas de baja intensidad en los niveles de IFN- γ , e IL-10. La inoculación de extracto polimerizado y motivos CpG induce una producción mayor de IFN- γ e IL-10 generada por la combinación del efecto del adyuvante y las propiedades inmunoquímicas del

extracto polimerizado mencionadas anteriormente. El comportamiento del extracto des-
pigmentado administrado en presencia de motivos CpG es similar al del polimerizado en
cuanto a los perfiles de citoquinas observados. Sin embargo, el extracto despigmentado
no es hipoalergénico (Casanovas *et al*, 2005).

A continuación se proponen tres modelos que intentan explicar los procesos que
tienen lugar tras inocular tres formulaciones que dieron lugar a respuestas de carácter
distinto: extracto nativo adsorbido a AIOH, extracto polimerizado adsorbido a AIOH y
extracto polimerizado en combinación con ODNs con motivos CpG.

1. Modelo de respuesta frente al extracto nativo adsorbido a AIOH (Figura 37)

La presentación de las proteínas del extracto nativo es fundamentalmente
mediada por anticuerpos lo cual, unido a las características del adyuvante, activa la
producción de IL-4 por parte de las células presentadoras. En este contexto se favorece
la diferenciación y proliferación de linfocitos de tipo Th2 productores de IL-4 e IL-5. La
presencia de IL-4 favorece el cambio de isotipo de IgM a IgE en linfocitos B e induce su
expansión clonal (Gould *et al*, 2003). La IL-4 y la IL-5 podrían favorecer la maduración de
basófilos, mastocitos y eosinófilos (Kay, 2001), que son las principales células efectoras
de la respuesta alérgica, tanto inmediata como tardía (Valenta, 2002).

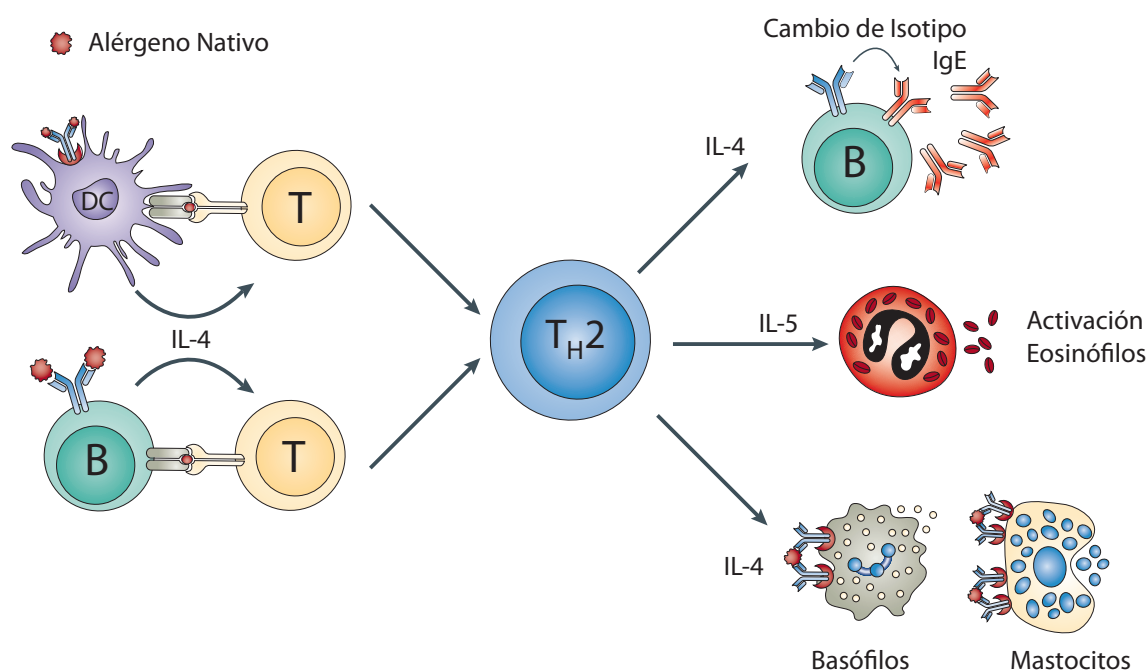


Figura 37. Modelo de respuesta frente al extracto nativo adsorbido a AIOH

2. Modelo de respuesta frente al extracto polimerizado adsorbido a AIOH (Figura 37)

Al administrarse esta formulación, el tipo de respuesta es similar a la observada cuando se utiliza el extracto nativo en las mismas condiciones. Existen tres diferencias fundamentales: en primer lugar, el extracto probablemente es presentado por la vía fagocítica (Akdis *et al.*, 1998), en segundo lugar se detectaron niveles mayores de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo tras la estimulación cruzada y tras la reestimulación y finalmente no se detecta una producción de IgE tan elevada como la observada al inocular el extracto nativo.

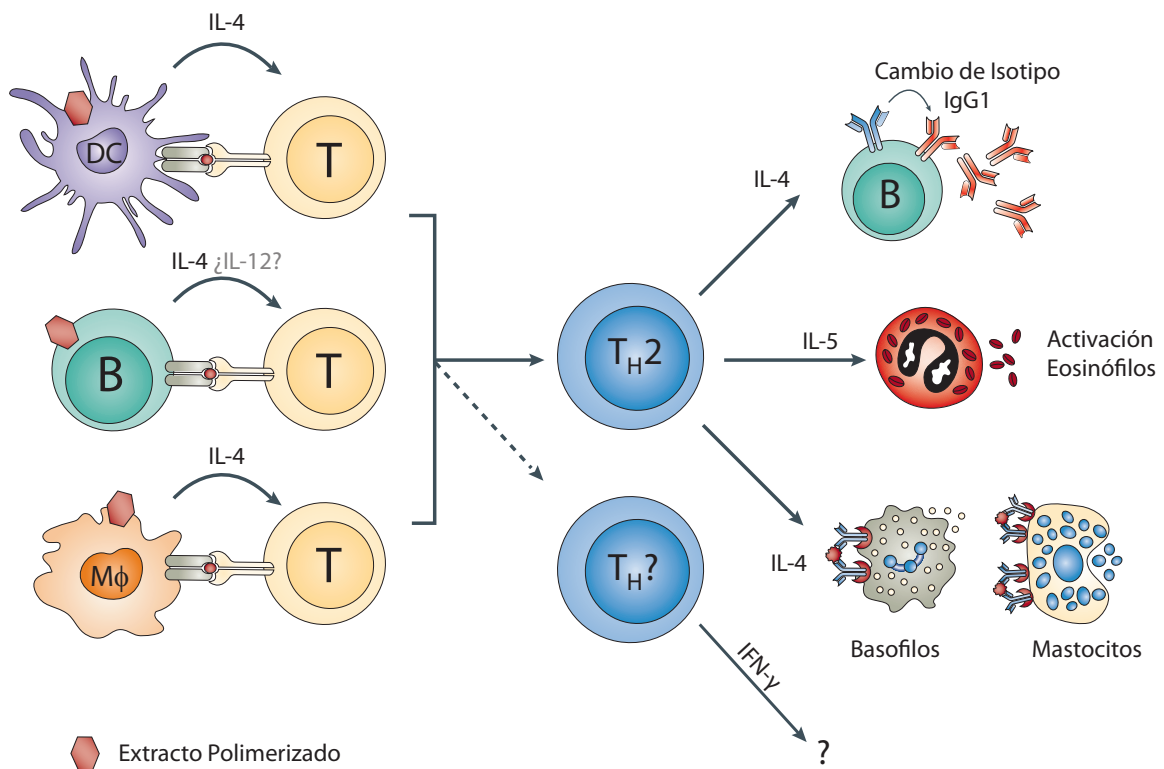


Figura 38. Modelo de respuesta frente al extracto nativo inoculado en presencia de CpG

3. Modelo de respuesta frente al extracto polimerizado inoculado en presencia de CpG (Figura 39)

Tras la inoculación del extracto polimerizado en presencia de motivos CpG hay dos factores que influirán en el tipo de respuesta que se desarrolla: las propiedades estructurales del extracto y el papel del adyuvante. El tamaño y la baja capacidad de unión a IgE del extracto polimerizado favorecen su presentación por la vía fagocítica. Paralelamente los motivos CpG promueven, vía TLR9, el reclutamiento de pDCs y provocan la activación temprana de linfocitos B y T (Heeg *et al.*, 2008). En este contexto se induce la producción de citoquinas (IL1- α , IL-6, IL-10 y posiblemente IL-12) cuyo efecto se traduce en la diferenciación y expansión clonal de linfocitos Th0 a linfocitos Th1 (productores de IFN- γ) (Akdis

y Blaser, 2000), Treg (productores de IL-10 y posiblemente TGF- β) (Brinster y Shevach, 2008) y Th17 no patogénicos (productores de IL-17 e IL-10) (McGeachy et al., 2007). El IFN- γ actúa principalmente favoreciendo el cambio de isotipo de IgG1 a IgG2a en linfocitos B. La IL-10 posiblemente actúe induciendo anergia en linfocitos B y T, y suprimiendo la activación y diferenciación de las distintas células efectoras de la respuesta alérgica (Larche, 2007).

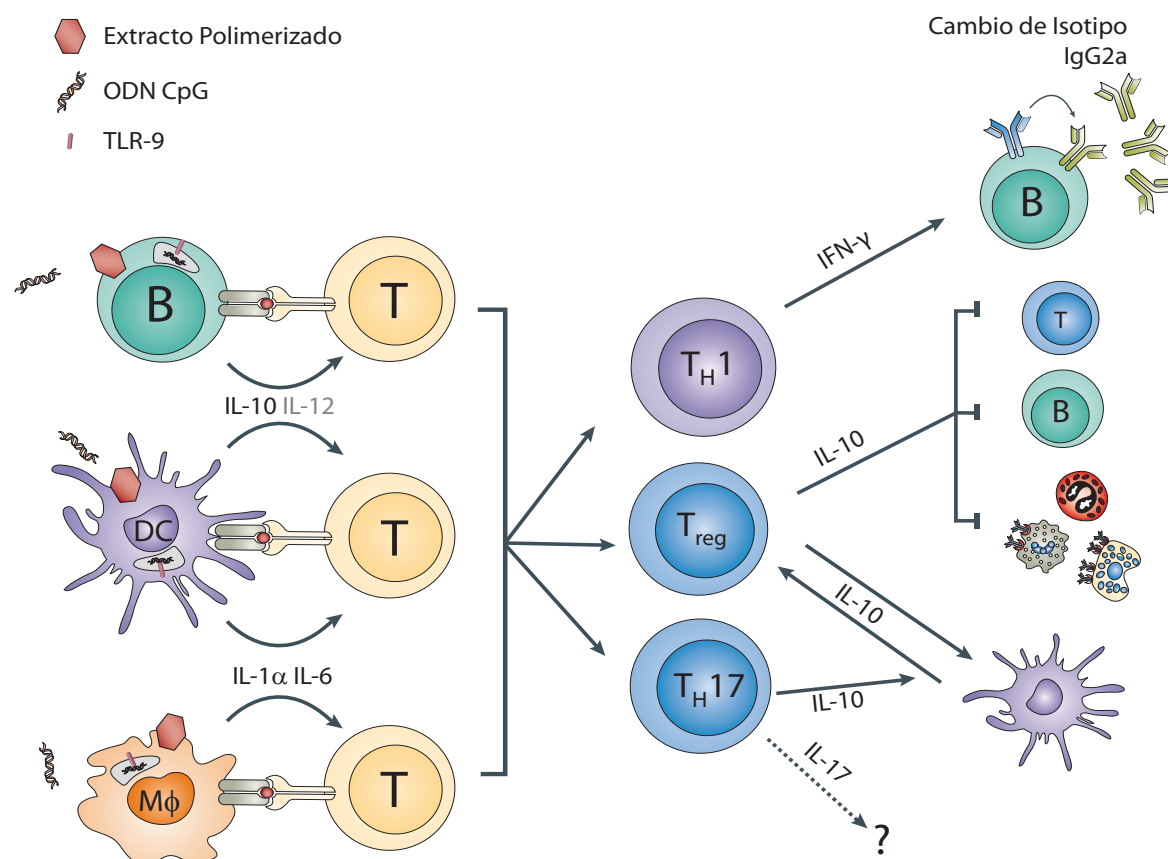


Figura 39. Modelo de respuesta frente al extracto polimerizado inoculado en presencia de ODN con motivosCpG

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman que, en presencia de un adyuvante tradicional como el AIOH, el extracto polimerizado parece la mejor opción de inmunoterapia de las tres analizadas. Sus características hipoalérgicas unidas a la producción de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos inmunizados con el extracto polimerizado adsorbido a AIOH posiblemente contribuyan a la mejor seguridad y eficacia ya descritas para esta formulación (Sager y Renner, 2004; Ameal et al., 2005; García-Robaina et al., 2006). En presencia de motivos CpG, el extracto polimerizado induce una respuesta de tipo Th1 (probablemente Th1-Treg), en el modelo de ratones BALB/c. Este tipo de respuesta está asociado con la eficacia de inmunoterapia específica

(Akdis y Blaser, 2000) y nos lleva a proponer que el uso del extracto polimerizado combinado con ODN con motivos CpG como adyuvante podría ser una alternativa a tener en cuenta en inmunoterapia.

Conclusiones

6. Conclusiones

- La respuesta frente al extracto nativo es dosis dependiente. De los tres extractos analizados, el extracto despigmentado es el más inmunogénico.
- El adyuvante con motivos CpG es el que potencia en mayor grado la respuesta IgG. Las combinaciones del extracto despigmentado y polimerizado con CpG son las más inmunogénicas.
- Tras la inmunización con cada uno de los extractos el repertorio de anticuerpos generado tiene características diferenciales.
- La inoculación de cada uno de los tres extractos en ausencia de adyuvante genera una respuesta de tipo Th2, con bajos niveles de IFN- γ y relaciones IgG2a/IgG1 claramente por debajo de la unidad.
- La administración de cualquiera de los extractos junto a ALOH genera una respuesta de tipo Th2 más exacerbada. La administración del extracto polimerizado junto a ALOH da lugar a la producción de mayores niveles de IFN- γ que los observados al inocular el extracto nativo o el extracto despigmentado con el mismo adyuvante.
- Cuando se administra el extracto nativo en presencia de ALOH se observa una elevada producción de IgE. Esta respuesta no se genera cuando se administra el extracto despigmentado o el polimerizado.
- La tendencia predominante a generar una respuesta humoral de tipo Th2 es revertida por los motivos CpG cuando se administran como adyuvantes. Esta reversión es más acusada cuando se administra con el extracto polimerizado. Los datos presentados indican, además, que el perfil de citoquinas generado por los motivos CpG cuando se administran con cualquiera de los tres extractos es de tipo Th1 (y posiblemente Th1-Treg). La intensidad de esta respuesta es mayor cuando se administra junto a los extractos modificados.

Bibliografía

7. Bibliografía

Abramson, M., Puy, R. y Weiner, J. (1999). Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* **54**, 1022-1041.

Ahn, J.H., Kim, C.H., Kim, Y.H., Kim, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.K., Kim, K.H., Moon, H.S., Song, J.S., Park, S.H. y Kwon, S.S. (2007). Inflammatory and remodeling events in asthma with chronic exposure to house dust mites: a murine model. *J Korean Med Sci* **22**, 1026-1033.

Akbari, O., DeKruyff, R.H. y Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* **2**, 725-731.

Akdis, C.A., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S.S., Muller, U. y Blaser, K. (1996). Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest* **98**, 1676-1683.

Akdis, C.A. y Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* **55**, 522-530.

Akdis, C.A., Blesken, T., Wymann, D., Akdis, M. y Blaser, K. (1998). Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG4 responses by conformational antigen variants. *Eur J Immunol* **28**, 914-925.

Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., *et al.* (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* **199**, 1567-1575.

Ameal, A., Vega-Chicote, J.M., Fernandez, S., Miranda, A., Carmona, M.J., Rondon, M.C., Reina, E. y Garcia-Gonzalez, J.J. (2005). Double-blind and placebo-controlled study to assess efficacy and safety of a modified allergen extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic asthma. *Allergy* **60**, 1178-1183.

Anderson, H.R., Poloniecki, J.D., Strachan, D.P., Beasley, R., Bjorksten, B. y Asher, M.I. (2001). Immunization and symptoms of atopic disease in children: results from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Am J Public Health* **91**, 1126-1129.

Arlian, L.G., Bernstein, D., Bernstein, I.L., Friedman, S., Grant, A., Lieberman, P., Lopez, M., Metzger, J., Platts-Mills, T., Schatz, M. y et al. (1992). Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. *J Allergy Clin Immunol* **90**, 292-300.

Arlian, L.G. y Platts-Mills, T.A. (2001). The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **107**, S406-413.

Asher, I. (2007). ISAAC International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatr Pulmonol* **42**, 100.

Asher, M.I., Keil, U., Anderson, H.R., Beasley, R., Crane, J., Martinez, F., Mitchell, E.A., Pearce, N., Sibbald, B., Stewart, A.W. y et al. (1995). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* **8**, 483-491.

Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gomez-Bayon, N., Martinez, A., Martinez, J. y Palacios, R. (1998). Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. (IFIDESA-ARISTEGUI, Research and Development Department, Bilbao, Spain. im000001@sarenet.es), pp. 27-30.

Bacchetta, R., Gambineri, E. y Roncarolo, M.G. (2007). Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 227-235; quiz 236-227.

Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* **347**, 911-920.

Baldrick, P., Richardson, D. y Wheeler, A.W. (2001). Safety evaluation of a glutaraldehyde modified tyrosine adsorbed housedust mite extract containing monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant: a new allergy vaccine for dust mite allergy. *Vaccine* **20**, 737-743.

Banerjee, B., Kelly, K.J., Fink, J.N., Henderson, J.D., Jr., Bansal, N.K. y Kurup, V.P. (2004). Modulation of airway inflammation by immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of allergic aspergillosis. *Infect Immun* **72**, 6087-6094.

Barnes, P.J., Chung, K.F. y Page, C.P. (1998). Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* **50**, 515-596.

Berrens, L. (1994). A process for the purification of aqueous extracts containing allergenically active proteins, extracts obtainable according to this process as well as their use. (España).

Bjorksten, B., Clayton, T., Ellwood, P., Stewart, A., Strachan, D. y Phase Iii Study Group, T.I. (2008). Worldwide time trends for symptoms of rhinitis and conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatr Allergy Immunol* **19**, 110-124.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Briere, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J.M., Saint-Remy, J.M. y Banchereau, J. (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (slgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med* **179**, 757-762.

Brimnes, J., Kildsgaard, J., Jacobi, H. y Lund, K. (2007). Sublingual immunotherapy reduces allergic symptoms in a mouse model of rhinitis. *Clin Exp Allergy* **37**, 488-497.

Brinster, C. y Shevach, E.M. (2008). Costimulatory effects of IL-1 on the expansion/differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ and CD4+CD25+Foxp3- T cells. *J Leukoc Biol* **84**, 480-487.

Broide, D., Schwarze, J., Tighe, H., Gifford, T., Nguyen, M.D., Malek, S., Van Uden, J., Martin-Orozco, E., Gelfand, E.W. y Raz, E. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* **161**, 7054-7062.

Brusselle, G., Kips, J., Joos, G., Bluethmann, H. y Pauwels, R. (1995). Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**, 254-259.

Calkhoven, P.G., Aalbers, M., Schilte, P.P., Yntema, B.J., Griffioen, R.W., van Nierop, J.C., Oranje, A.P. y Aalberse, R.C. (1991). Newly generated IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* in children are directed against components distinct from Der p I and Der p II. *J Allergy Clin Immunol* **88**, 265-271.

Cardaba, B., Llanes, E., Chacartegui, M., Sastre, B., Lopez, E., Molla, R., del Pozo, V., Florido, F., Quiralte, J., Palomino, P. y Lahoz, C. (2007). Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* **17 Suppl 1**, 31-35.

Casanovas, M., Fernandez-Caldas, E., Alamar, R. y Basomba, A. (2005a). Comparative study of tolerance between unmodified and high doses of chemically modified allergen vaccines of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol* **137**, 211-218.

Casanovas, M., Gomez, M.J., Carnes, J. y Fernandez-Caldas, E. (2005b). Skin tests with native, depigmented and glutaraldehyde polymerized allergen extracts. *J Investig Allergol Clin Immunol* **15**, 30-36.

Casanovas, M., Martin, R., Jimenez, C., Caballero, R. y Fernandez-Caldas, E. (2007). Safety of immunotherapy with therapeutic vaccines containing depigmented and polymerized allergen extracts. *Clin Exp Allergy* **37**, 434-440.

Cohn, L., Homer, R.J., Marinov, A., Rankin, J. y Bottomly, K. (1997). Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* **186**, 1737-1747.

Colloff, M.J., Stewart, G.A. y Thompson, P.J. (1991). House dust acarofauna and Der p I equivalent in Australia: the relative importance of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Euroglyphus maynei*. *Clin Exp Allergy* **21**, 225-230.

Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T. y Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* **182**, 1591-1596.

Cooke, R.A., Barnard, J.H., Hebdal, S. y Stull, A. (1935). Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *J Exp Med* **62**, 733-750.

Cools, M., Van Bever, H.P., Weyler, J.J. y Stevens, W.J. (2000). Long-term effects of specific immunotherapy, administered during childhood, in asthmatic patients allergic to either house-dust mite or to both house-dust mite and grass pollen. *Allergy* **55**, 69-73.

Chua, K.Y., Doyle, C.R., Simpson, R.J., Turner, K.J., Stewart, G.A. y Thomas, W.R. (1990). Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *International archives of allergy and applied immunology* **91**, 118-123.

Chua, K.Y., Stewart, G.A., Thomas, W.R., Simpson, R.J., Dilworth, R.J., Plozza, T.M. y Turner, K.J. (1988). Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* **167**, 175-182.

de Heer, H.J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A., Hoogsteden, H.C. y Lambrecht, B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* **200**, 89-98.

de Weck, A.L., Mayer, P., Stumper, B., Schiessl, B. y Pickart, L. (1997). Dog allergy, a model for allergy genetics. *Int Arch Allergy Immunol* **113**, 55-57.

Denepoux, S., Eibensteiner, P.B., Steinberger, P., Vrtala, S., Visco, V., Weyer, A., Kraft, D., Banchereau, J., Valenta, R. y Lebecque, S. (2000). Molecular characterization of human IgG monoclonal antibodies specific for the major birch pollen allergen Bet v 1. Anti-allergen IgG can enhance the anaphylactic reaction. *FEBS Lett* **465**, 39-46.

Durham, S.R., Walker, S.M., Varga, E.M., Jacobson, M.R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S.J., Hamid, Q.A. y Nouri-Aria, K.T. (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* **341**, 468-475.

Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Willheim, M., Wiedermann, U., Schenk, S., Klotz, F., Ebner, H., Kraft, D. y Scheiner, O. (1997). Immunological changes

during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* **27**, 1007-1015.

Ellwood, P., Asher, M.I., Beasley, R., Clayton, T.O. y Stewart, A.W. (2005). The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods. *Int J Tuberc Lung Dis* **9**, 10-16.

Falade, A.G., Olawuyi, J.F., Osinusi, K. y Onadeko, B.O. (2004). Prevalence and severity of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema in 6- to 7-year-old Nigerian primary school children: the international study of asthma and allergies in childhood. *Med Princ Pract* **13**, 20-25.

Fan, T., Yang, M., Halayko, A., Mohapatra, S.S. y Stephens, N.L. (1997). Airway responsiveness in two inbred strains of mouse disparate in IgE and IL-4 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**, 156-163.

Fernández-Caldas, E., Gallego, M., Carnes, J. y Iraola, V. (2008). Enzymatic activity of *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts after acidic treatment. *Int Arch Allergy Immunol* **145**, 298-304.

Fernández-Caldas, E., Iraola, V., Boquete, M., Nieto, A. y Casanovas, M. (2006). Mite immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep* **6**, 413-419.

Fernandez Benitez, M., Guillen, F., Marin, B., Pajaron, M.J., Brun, C., Aguinaga, I., Esteban, M.A., Garcia, B., Martinez Gonzalez, M.A., Notivol, P., *et al.* (1996). International study of asthma and allergies in childhood. Results of the first phase of the I.S.A.A.C. project in Pamplona, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol* **6**, 288-293.

Forgacs, P. y Swan, A.V. (1968). Treatment of house dust allergy. A report from the Research Committee of the British Tuberculosis Association. *Br Med J* **3**, 774-777.

Garcia-Robaina, J.C., Sanchez, I., de la Torre, F., Fernandez-Caldas, E. y Casanovas, M. (2006). Successful management of mite-allergic asthma with modified extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in a double-blind, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 1026-1032.

Gould, H.J. y Sutton, B.J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* **8**, 205-217.

Gould, H.J., Sutton, B.J., Beavil, A.J., Beavil, R.L., McCloskey, N., Coker, H.A., Fear, D. y Smurthwaite, L. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* **21**, 579-628.

Green, W.F., Woolcock, A.J., Stuckey, M., Sedgwick, C. y Leeder, S.R. (1986). House dust mites and skin tests in different Australian localities. *Australian and New Zealand journal of medicine* **16**, 639-643.

Gustafsson, D., Sjoberg, O. y Foucard, T. (2000). Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis--a prospective follow-up to 7 years of age. *Allergy* **55**, 240-245.

Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* **5**, 505-517.

Hales, B.J., Laing, I.A., Pearce, L.J., Hazell, L.A., Mills, K.L., Chua, K.Y., Thornton, R.B., Richmond, P., Musk, A.W., James, A.L., *et al.* (2007). Distinctive immunoglobulin E anti-house dust allergen-binding specificities in a tropical Australian Aboriginal community. *Clin Exp Allergy* **37**, 1357-1363.

Hales, B.J., Martin, A.C., Pearce, L.J., Laing, I.A., Hayden, C.M., Goldblatt, J., Le Souef, P.N. y Thomas, W.R. (2006). IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 361-367.

Halkjaer, L.B., Loland, L., Buchvald, F.F., Agner, T., Skov, L., Strand, M. y Bisgaard, H. (2006). Development of atopic dermatitis during the first 3 years of life: the Copenhagen prospective study on asthma in childhood cohort study in high-risk children. *Arch Dermatol* **142**, 561-566.

Hamelmann, E., Takeda, K., Schwarze, J., Vella, A.T., Irvin, C.G. y Gelfand, E.W. (1999). Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyper-responsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 480-489.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. y Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-1132.

Hart, B.J. y Whitehead, L. (1990). Ecology of house dust mites in Oxfordshire. *Clin Exp Allergy* **20**, 203-209.

Heeg, K., Dalpke, A., Peter, M. y Zimmermann, S. (2008). Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides. *Int J Med Microbiol* **298**, 33-38.

Herz, U., Renz, H. y Wiedermann, U. (2004). Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods* **32**, 271-280.

Hewitt, C.R., Brown, A.P., Hart, B.J. y Pritchard, D.I. (1995). A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med* **182**, 1537-1544.

Hisbergues, M., Magi, M., Rigaux, P., Steuve, J., Garcia, L., Goudercourt, D., Pot, B., Pestel, J. y Jacquet, A. (2007). In vivo and in vitro immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by *Lactobacillus plantarum* bacteria. *Clin Exp Allergy* **37**, 1286-1295.

Holgate, S.T. (2007a). Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 1233-1244; quiz 1245-1236.

Holgate, S.T. (2007b). The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol* **28**, 248-251.

Horner, A.A. y Raz, E. (2002). Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 706-712.

Hunter, R.L. (2002). Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* **20 Suppl 3**, S7-12.

Huss, K., Adkinson, N.F., Jr., Eggleston, P.A., Dawson, C., Van Natta, M.L. y Hamilton, R.G. (2001). House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. *J Allergy Clin Immunol* **107**, 48-54.

Hussain, I., Jain, V.V., Kitagaki, K., Businga, T.R., O'Shaughnessy, P. y Kline, J.N. (2002). Modulation of murine allergic rhinosinusitis by CpG oligodeoxynucleotides. *Laryngoscope* **112**, 1819-1826.

Ibero, M. y Castillo, M.J. (2006). Significant improvement of specific bronchial hyperreactivity in asthmatic children after 4 months of treatment with a modified extract of *dermatophagoides pteronyssinus*. *J Investig Allergol Clin Immunol* **16**, 194-202.

Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C. y Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* **165**, 6107-6115.

Iraola, V. y Fernández-Caldas, E. (2005). Mite map of Spain. In *Allergy Clin Immunol Int: J World Allergy Org* pp. 228-229.

ISAAC (1998a). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* **351**, 1225-1232.

ISAAC (1998b). Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* **12**, 315-335.

Jahnsen, F.L., Lund-Johansen, F., Dunne, J.F., Farkas, L., Haye, R. y Brandtzaeg, P. (2000). Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol* **165**, 4062-4068.

Jain, V.V., Kitagaki, K. y Kline, J.N. (2003). CpG DNA and immunotherapy of allergic airway diseases. *Clin Exp Allergy* **33**, 1330-1335.

Janeway, C. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 6th edn (New York: Garland Science).

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. y Enk, A.H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 1213-1222.

Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszc, M., Blaser, K. y Akdis, C.A. (2003). IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* **33**, 1205-1214.

Karol, M.H. (1994). Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J* **7**, 555-568.

Kawano, Y., Noma, T. y Yata, J. (1994). Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol* **153**, 4948-4958.

Kay, A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* **344**, 30-37.

Kim, S.W. y Yeo, S.W. (2007). The effect of Bacillus Calmette-Guerin in a mouse model of allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* **136**, 720-725.

KleinJan, A., Willart, M., van Rijt, L.S., Braunstahl, G.J., Leman, K., Jung, S., Hoogsteden, H.C. y Lambrecht, B.N. (2006). An essential role for dendritic cells in human and experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 1117-1125.

Kohama, Y., Akizuki, O., Hagihara, K., Yamada, E. y Yamamoto, H. (1999). Immunostimulatory oligodeoxynucleotide induces TH1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 1231-1238.

Koppelman, G.H. (2007). Gene-environment interaction in allergic disease: more questions, more answers? *J Allergy Clin Immunol* **120**, 1266-1268.

Kumar, R.K., Herbert, C., Yang, M., Koskinen, A.M., McKenzie, A.N. y Foster, P.S. (2002). Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodeling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* **32**, 1104-1111.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lambrecht, B.N., Pauwels, R.A. y Fazekas De St Groth, B. (2000). Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol* **164**, 2937-2946.

Larche, M. (2007). Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest* **132**, 1007-1014.

Larche, M., Akdis, C.A. y Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**, 761-771.

Lee, S.L., Wong, W. y Lau, Y.L. (2004). Increasing prevalence of allergic rhinitis but not asthma among children in Hong Kong from 1995 to 2001 (Phase 3 International Study of Asthma and Allergies in Childhood). *Pediatr Allergy Immunol* **15**, 72-78.

Lichtenstein, L.M., Holtzman, N.A. y Burnett, L.S. (1968). A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J Immunol* **101**, 317-324.

Liebeler, C.L., Basu, S. y Jackola, D.R. (2007). Allergen-specific IgG1 provides parsimonious heritability estimates for atopy-associated immune responses to allergens. *Hum Immunol* **68**, 113-121.

Lovik, M., Alberg, T., Nygaard, U.C., Samuelsen, M., Groeng, E.C. y Gaarder, P.I. (2007). Popliteal lymph node (PLN) assay to study adjuvant effects on respiratory allergy. *Methods* **41**, 72-79.

Lugogo, N.L., Ginsburg, G.S. y Que, L.G. (2007). Genetic profiling and tailored therapy in asthma: are we there yet? *Curr Opin Mol Ther* **9**, 528-537.

Maasch, H.J. y Marsh, D.G. (1987). Standardized extracts modified allergens--allergoids. *Clin Rev Allergy* **5**, 89-106.

Mallol, J., Sole, D., Asher, I., Clayton, T., Stein, R. y Soto-Quiroz, M. (2000). Prevalence of asthma symptoms in Latin America: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Pulmonol* **30**, 439-444.

Marsh, D.G., Lichtenstein, L.M. y Campbell, D.H. (1970). Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* **18**, 705-722.

Marsland, B.J. y Kopf, M. (2007). Toll-like receptors: paving the path to T cell-driven autoimmunity? *Curr Opin Immunol* **19**, 611-614.

Martin, I.R., Henwood, J.L., Wilson, F., Koning, M.M., Pike, A.J., Smith, S. y Town, G.I. (1997). House dust mite and cat allergen levels in domestic dwellings in Christchurch. *The New Zealand medical journal* **110**, 229-231.

Mastrandrea, F., Serio, G., Minardi, A., Coradduzza, G., Rossi, N., Scarcia, G., Maietta, G., Iacobelli, A., Lamanna, C. y Tursi, A. (1997). IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. *Allergy* **52**, 1115-1119.

Maunsell, K., Wraith, D.G. y Hughes, A.M. (1971). Hyposensitisation in mite asthma. *Lancet* **1**, 967-968.

Mayr, S.I., Zuberi, R.I. y Liu, F.T. (2003). Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. *Braz J Med Biol Res* **36**, 821-827.

Mazzoni, A., Young, H.A., Spitzer, J.H., Visintin, A. y Segal, D.M. (2001). Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* **108**, 1865-1873.

McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T. y Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* **8**, 1390-1397.

Mo, J.H., Park, S.W., Rhee, C.S., Takabayashi, K., Lee, S.S., Quan, S.H., Kim, I.S., Min, I.Y., Raz, E. y Lee, C.H. (2006). Suppression of allergic response by CpG motif oligodeoxynucleotide-house-dust mite conjugate in animal model of allergic rhinitis. *Am J Rhinol* **20**, 212-218.

Moore, M.M., Rifas-Shiman, S.L., Rich-Edwards, J.W., Kleinman, K.P., Camargo, C.A., Jr., Gold, D.R., Weiss, S.T. y Gillman, M.W. (2004). Perinatal predictors of atopic dermatitis occurring in the first six months of life. *Pediatrics* **113**, 468-474.

Muller, K.M., Jaunin, F., Masouye, I., Saurat, J.H. y Hauser, C. (1993). Th2 cells mediate IL-4-dependent local tissue inflammation. *J Immunol* **150**, 5576-5584.

Nadchatram, M. (2005). House dust mites, our intimate associates. *Tropical biomedicine* **22**, 23-37.

Noon, L. (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*, 1572-1573.

Nouri-Aria, K.T., Wachholz, P.A., Francis, J.N., Jacobson, M.R., Walker, S.M., Wilcock, L.K., Staple, S.Q., Aalberse, R.C., Till, S.J. y Durham, S.R. (2004). Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* **172**, 3252-3259.

O'Brien, R.M., Byron, K.A., Varigos, G.A. y Thomas, W.R. (1997). House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-gamma and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* **27**, 46-51.

Oboki, K., Ohno, T., Saito, H. y Nakae, S. (2008). Th17 and allergy. *Allergol Int* **57**, 121-134.

Oehling, A.K., Sanz, M.L. y Resano, A. (1998). Importance of IgG4 determination in in vitro immunotherapy follow-up of inhalant allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* **8**, 333-339.

Ohkawara, Y., Lim, K.G., Xing, Z., Glibetic, M., Nakano, K., Dolovich, J., Croitoru, K., Weller, P.F. y Jordana, M. (1996). CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest* **97**, 1761-1766.

Olesen, A.B., Ellingsen, A.R., Olesen, H., Juul, S. y Thestrup-Pedersen, K. (1997). Atopic dermatitis and birth factors: historical follow up by record linkage. *BMJ* **314**, 1003-1008.

Olsen, O.T., Larsen, K.R., Jacobsen, L. y Svendsen, U.G. (1997). A 1-year, placebo-controlled, double-blind house-dust-mite immunotherapy study in asthmatic adults. *Allergy* **52**, 853-859.

Pallas, D.C., Schley, C., Mahoney, M., Harlow, E., Schaffhausen, B.S. y Roberts, T.M. (1986). Polyomavirus small t antigen: overproduction in bacteria, purification, and utilization for monoclonal and polyclonal antibody production. *J Virol* **60**, 1075-1084.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. y Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141.

Pearce, N., Ait-Khaled, N., Beasley, R., Mallol, J., Keil, U., Mitchell, E. y Robertson, C. (2007). Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* **62**, 758-766.

Piboonpocanun, S., Malainual, N., Jirapongsananuruk, O., Vichyanond, P. y Thomas, W.R. (2006). Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens. *Clin Exp Allergy* **36**, 510-516.

Pittner, G., Vrtala, S., Thomas, W.R., Weghofer, M., Kundi, M., Horak, F., Kraft, D. y Valenta, R. (2004). Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. *Clin Exp Allergy* **34**, 597-603.

Purvis, D.J., Thompson, J.M., Clark, P.M., Robinson, E., Black, P.N., Wild, C.J. y Mitchell, E.A. (2005). Risk factors for atopic dermatitis in New Zealand children at 3.5 years of age. *Br J Dermatol* **152**, 742-749.

Rhee, C.S., Libet, L., Chisholm, D., Takabayashi, K., Baird, S., Bigby, T.D., Lee, C.H., Horner, A.A. y Raz, E. (2004). Allergen-independent immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide therapy attenuates experimental allergic rhinitis. *Immunology* **113**, 106-113.

Royer, B., Varadaradjalou, S., Saas, P., Guillosson, J.J., Kantelip, J.P. y Arock, M. (2001). Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* **31**, 694-704.

Sager, A. y Renner, B. (2004). Safety aspects and course of allergen-specific immunotherapy with a depigmented, polymerized allergen extract. *Allergo Journal* **13**, 386-391.

Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sastre, J., Iraola, V., Figueredo, E., Tornero, P. y Fernandez-Caldas, E. (2002). Mites in Madrid. *Allergy* **57**, 58-59.

Schleimer, R.P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D. y Avila, P.C. (2007). Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 1279-1284.

Schmidt-Weber, C.B., Akdis, M. y Akdis, C.A. (2007). TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 247-254.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., *et al.* (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* **203**, 1693-1700.

Shah, A.A. (1994). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *J Assoc Physicians India* **42**, 265.

Shardonofsky, F.R., Venzor, J., 3rd, Barrios, R., Leong, K.P. y Huston, D.P. (1999). Therapeutic efficacy of an anti-IL-5 monoclonal antibody delivered into the respiratory tract in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 215-221.

Smith, A.M., Yamaguchi, H., Platts-Mills, T.A. y Fu, S.M. (1998). Prevalence of IgG anti-Der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure groups: relationship of IgG and subclass antibody responses to exposure and allergic symptoms. *Clin Immunol Immunopathol* **86**, 102-109.

Smith, A.P. (1971). Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen: trial in asthma induced by house dust. *Br Med J* **4**, 204-206.

Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. y Vitetta, E.S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**, 255-258.

Stewart, G.A., Dowse, G.K., Turner, K.J., Alpers, M.P. y Nisbet, A. (1988). Isotype specific immunoglobulin responses to the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* and the purified allergen Der p 1 in asthmatic and control subjects from the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Clin Allergy* **18**, 235-243.

Tame, A., Sakiyama, Y., Kobayashi, I., Terai, I. y Kobayashi, K. (1996). Differences in titres of IgE, IgG4 and other IgG subclass anti-Der p 2 antibodies in allergic and non-allergic patients measured with recombinant allergen. *Clin Exp Allergy* **26**, 43-49.

Tanaka, H., Demeure, C.E., Rubio, M., Delespesse, G. y Sarfati, M. (2000). Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* **192**, 405-412.

Thomas, W.R., Heinrich, T.K., Smith, W.A. y Hales, B.J. (2007). Pyroglyphid house dust mite allergens. *Protein and peptide letters* **14**, 943-953.

Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Van Nest, G., Tuck, S., Eiden, J.J., Kagey-Sobotka, A., Creticos, P.S., Lichtenstein, L.M., Spiegelberg, H.L. y Raz, E. (2000). Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 124-134.

Tovey, E.R., Chapman, M.D. y Platts-Mills, T.A. (1981). Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* **289**, 592-593.

Tulic, M.K., Fiset, P.O., Christodoulopoulos, P., Vaillancourt, P., Desrosiers, M., Lavigne, F., Eiden, J. y Hamid, Q. (2004). Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 235-241.

Valenta, R. (2002). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol* **2**, 446-453.

Valenta, R. y Kraft, D. (2002). From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **14**, 718-727.

Vanna, A.T., Yamada, E., Arruda, L.K., Naspitz, C.K. y Sole, D. (2001). International Study of Asthma and Allergies in Childhood: validation of the rhinitis symptom questionnaire and prevalence of rhinitis in schoolchildren in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Allergy Immunol* **12**, 95-101.

Varney, V.A., Tabbah, K., Mavroleon, G. y Frew, A.J. (2003). Usefulness of specific immunotherapy in patients with severe perennial allergic rhinitis induced by house dust mite: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* **33**, 1076-1082.

Verhoef, A., Alexander, C., Kay, A.B. y Larche, M. (2005). T cell epitope immunotherapy induces a CD4+ T cell population with regulatory activity. *PLoS Med* **2**, e78.

Visco, V., Dolecek, C., Denepoux, S., Le Mao, J., Guret, C., Rousset, F., Guinnepain, M.T., Kraft, D., Valenta, R., Weyer, A., *et al.* (1996). Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *J Immunol* **157**, 956-962.

von Pirquet, C. (1906). Allergie. *Munch Med Wochenschr* **53**, 1457.

Voorhorst, R., Spieksma-Boezeman, M.I. y Spieksma, F.T. (1964). Is a Mite (*Dermatophagoides Sp.*) the Producer of the House-Dust Allergen? *Allergie und Asthma* **10**, 329-334.

Vrtala, S., Ball, T., Spitzauer, S., Pandjaitan, B., Suphioglu, C., Knox, B., Sperr, W.R., Valent, P., Kraft, D. y Valenta, R. (1998). Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation. *J Immunol* **160**, 6137-6144.

Walker, C., Checkel, J., Cammisuli, S., Leibson, P.J. y Gleich, G.J. (1998). IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation. *J Immunol* **161**, 1962-1969.

Wang, H., Lin, X., Hao, C., Zhang, C., Sun, B., Zheng, J., Chen, P., Sheng, J., Wu, A. y Zhong, N. (2006). A double-blind, placebo-controlled study of house dust mite immunotherapy in Chinese asthmatic patients. *Allergy* **61**, 191-197.

Webb, D.C., Mahalingam, S., Cai, Y., Matthaei, K.I., Donaldson, D.D. y Foster, P.S. (2003). Antigen-specific production of interleukin (IL)-13 and IL-5 cooperate to mediate IL-4 α -independent airway hyperreactivity. *Eur J Immunol* **33**, 3377-3385.

Weiland, S.K., Bjorksten, B., Brunekreef, B., Cookson, W.O., von Mutius, E. y Strachan, D.P. (2004). Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. *Eur Respir J* **24**, 406-412.

Westritschnig, K., Sibanda, E., Thomas, W., Auer, H., Aspöck, H., Pittner, G., Vrtala, S., Spitzauer, S., Kraft, D. y Valenta, R. (2003a). Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. *Clin Exp Allergy* **33**, 22-27.

Westritschnig, K., Sibanda, E., Thomas, W., Auer, H., Aspöck, H., Pittner, G., Vrtala, S., Spitzauer, S., Kraft, D. y Valenta, R. (2003b). Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. pp. 22-27.

Wharton, G.W. (1976). House dust mites. *Journal of medical entomology* **12**, 577-621.

Williams, H., Robertson, C., Stewart, A., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, R., Asher, I., Beasley, R., Bjorksten, B., Burr, M., *et al.* (1999). Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 125-138.

Wing, K., Fehervari, Z. y Sakaguchi, S. (2006). Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* **18**, 991-1000.

Wurtzen, P.A., Lund, L., Lund, G., Holm, J., Millner, A. y Henmar, H. (2007). Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity. *Int Arch Allergy Immunol* **144**, 287-295.

Wuthrich, B., Gumowski, P.L., Fah, J., Hurlimann, A., Deluze, C., Andre, C., Fadel, R. y Carat, F. (2001). Safety and efficacy of specific immunotherapy with standardized allergenic extracts adsorbed on aluminium hydroxide. *J Invest Allergol Clin Immunol* **11**, 149-156.

Yeoh, S.M., Kuo, I.C., Wang, D.Y., Liam, C.K., Sam, C.K., De Bruyne, J.A., Lee, B.W., Cheong, N. y Chua, K.Y. (2003). Sensitization profiles of Malaysian and Singaporean subjects to allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol* **132**, 215-220.

Zhang, J., Pare, P.D. y Sandford, A.J. (2008). Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* **9**, 4.

Zock, J.P., Heinrich, J., Jarvis, D., Verlato, G., Norback, D., Plana, E., Sunyer, J., Chinn, S., Olivieri, M., Soon, A., *et al.* (2006). Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 682-690.

Zosky, G.R. y Sly, P.D. (2007). Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* **37**, 973-988.